

Reformulering, prosessutvikling og stabilitetstesting av *Fenylefrin 0,1 mg/ml* *injeksjonsvæske*

Live Kristin Andersen



Hovedoppgave i galenisk farmasi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO
November 2007

FORORD

Hovedoppgaven er utført ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet i perioden november 2006 til november 2007.

Hovedveileder Jørgen Brustugun: Jeg vil benytte sjansen til å takke for all hjelp. Takk for din tålmodighet og faglige veiledning, og spesielt for gode innspill og diskusjoner under skrivingen av oppgaven.

Veileder Solveig Kristensen: Takk for gode kommentarer og faglige tips!

Avdeling analyse: Takk for gode samtaler og lånet av hyggelig labplass på analysen. Dere stiller opp når det trengs! En spesiell takk til Marit Gulla som alltid er ekstra blid og hjelpsom.

Avdeling Produksjon: Blide fjes og velvillig hjelp kom godt med. En ekstra takk til Duc som skaffet meg de ampullene med preparat som jeg trengte til alle forsøkene, og som dessuten lånte meg autoklaven til mine laaaange varmebehandlingsforsøk.

Min samboer Jan-Roger Rugset: Du stiller alltid opp for meg uansett hvor mye du selv har å gjøre. Tusen takk! Jeg vil dessuten takke deg for all støtte og oppmuntring. Dine innspill har stor betydning!

Mamma, Pappa, Lars og Linn: Takk for deres tålmodighet og støtte. Dere har alltid stilt opp for meg og hjulpet meg videre! Mamma, dine eksamenshorn har kommet godt med!

INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	6
FORKORTELSER	9
1. INNLEDNING	11
1.1 BAKGRUNN OG HENSIKT	11
1.2 FENYLEFRIN.....	11
1.2.1 Farmakologiske egenskaper og bruk.....	12
1.2.2 Farmakokinetikk	12
1.2.3 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for fenylefrin.....	13
1.2.4 Stabilitet.....	14
1.2.4.1 Oksidasjon	14
1.2.4.2 pH.....	15
1.2.4.3 Temperatur	16
1.2.4.4 Lys	17
1.2.5 Analyse	20
1.3 FORMULERING AV INJEKSJONER.....	21
1.3.1 Rikshospitalets fenylefrinpreparat	22
1.3.2 Hjelpstoffer	23
2. EKSPERIMENTELT	31
2.1 STOFFLISTE	31
2.2 INSTRUMENTER OG UTSTYR.....	32
2.3 LØSNINGER.....	37
2.3.1 Validering av HPLC-analysemetode.....	37
2.3.3 Formulering, produksjonsprosess og stresstesting.....	42
2.3.4 Degassing av fysiologisk saltvann	47
2.3.5 Stabilitetstesting.....	47
3. METODER.....	49
3.1 VALIDERING AV ANALYSEMETODE.....	49
3.1.1 Linearitet.....	49
3.1.2 Nøyaktighet.....	49
3.1.3 Intradagvariasjon.....	50
3.1.4 Systempresisjon	50
3.1.5 Interdagvariasjon.....	50
3.1.6 Spesifisitet	50
3.1.7 Robusthet.....	51
3.1.8 Prøvestabilitet	51
3.2 PREFORMULERING	51
3.2.1 Kjemisk degradering	51
3.2.2 Varmedegradering: innledende forsøk.....	52
3.3 FORMULERING, PRODUKSJONSPROSESS OG STRESSTESTING ..	53
3.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet	53
3.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet.....	54
3.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet	55
3.4 DEGASSING AV FYSIOLOGISK SALT VANN.....	55
3.5 STABILITETSTESTING	56
3.5.1 Stabilitet på sprøyte.....	56
3.5.2 Stabilitet i lys	57

3.5.2.1 Lysstabilitet i prøver med og uten natriummetabisulfitt	58
3.5.2.2 Lysstabilitet i prøver med ulike mengder 5-HMF	58
3.5.3 Langtidsstabilitet	58
3.5.3.1 Pilotbatch	58
3.5.3.2 Stabilitetsstudie av Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske	59
4. RESULTATER OG DISKUSJON	61
4.1 VALIDERING AV HPLC-METODEN	61
4.1.1 Linearitet	61
4.1.2 Nøyaktighet	62
4.1.3 Intradagvariasjon	62
4.1.4 Systempresisjon	63
4.1.5 Interdagvariasjon	63
4.1.6 Spesifisitet	64
4.1.7 Robusthet	64
4.1.8 Prøvestabilitet	66
4.2 PREFORMULERING	67
4.2.1 Utvikling av betingelser for stresstesting	67
4.2.1.1 Kjemisk degradering	67
4.2.1.2 Varmedegradering: innledende forsøk	70
4.3 FORMULERING, PRODUKSJONSPROSESS OG STRESSTESTING ..	72
4.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet	73
4.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet	76
4.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet	79
4.4 DEGASSING AV FYSIOLOGISK SALTVANN	81
4.5 LANGTIDSSTABILITETSTESTING	84
4.5.1 Stabilitet på sprøyte	84
4.5.2 Stabilitet i lys	92
4.5.2.1 Med og uten natriummetabisulfitt	94
4.5.2.2 Ulike mengder 5-HMF	95
4.5.3 Langtidsstabilitet	97
4.5.3.1 Pilotbatch	97
4.5.3.2 Stabilitetsstudie av Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske	99
5. KONKLUSJON	101
6. REFERANSER	103
7. VEDLEGG	106
Vedlegg 1: Hovedforskrift for <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i> per 15.mars 2007	106
Vedlegg 2: Etikett fra dagens norske preparat	109
Vedlegg 3: Etikett fra dagens svenske preparat	109
Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet	110
Vedlegg 5: Transmisjonsspekter for polypropylenrør benyttet i lysforsøk utført i Suntest CPS	111
Vedlegg 6: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket BD Plastipak (20 ml) som benyttes ved sykehusets operasjonsstuer	112
Vedlegg 7: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Terumo (20 ml)	113
Vedlegg 8: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Codan (20 ml)	114
Vedlegg 9: Tabell med resultater fra varmebehandlede fenylefrinløsninger med ulike mengder natriummetabisulfitt	115
Vedlegg 10: Stabilitet av dagens preparat i hetteglass og i ulike sprøyter	116

Vedlegg 11: Resultatoversikt fra stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml</i> <i>injeksjonsvæske</i>	117
ERRATA	118

SAMMENDRAG

Det finnes indikasjoner på at den reelle holdbarhetstiden til *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* som produseres på Sykehusapoteket ved Rikshospitalet reelt sett er lengre enn dagens 6 måneder. Dersom holdbarhetstiden kan utvides vil dette kunne forenkle både produksjon og logistikk. Det var derfor ønskelig å undersøke om *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* kan produseres med lengre holdbarhet enn i dag – enten med dagens formulering, eller med en ny formulering.

En stabilitetsindikerende HPLC-metode er utviklet og validert.

Det er utviklet en degraderingsmetode for fenylefrin ved bruk av økt temperatur (121 °C i 10 timer). Denne ble benyttet til sammenligning av stabiliseringseffekten for ulike stabilisatorer. Mildere behandling ble forsøkt, men viste seg å ikke gi tilstrekkelig degradering av fenylefrin. Degraderingsmetoden er derfor utvilsomt hard, men hovedtrenden i stabilitetseffekt ble vist også i forsøk utført ved romtemperatur.

Effekten av natriummetabisulfitt på stabiliteten av fenylefrin er studert. Det er funnet at mengden natriummetabisulfitt som finnes i dagens preparat (0,5 mg/ml) gir dårligere stabilitet enn alle andre undersøkte konsentrasjoner av denne antioksidanten. Dette gjelder så vel ved romtemperatur som ved forhøyet temperatur (121 °C). Ved forhøyet temperatur over lang tid (121 °C, 10 timer) er det funnet at prøver uten natriummetabisulfitt, eller en konsentrasjon av natriummetabisulfitt som er lavere enn dagens konsentrasjon, har en forbedret stabilitet. Høyere konsentrasjoner av natriummetabisulfitt (0,75-10,0 mg/ml) har også bedre stabilitet enn dagens konsentrasjon. Dagens mengde natriummetabisulfitt ser dermed ikke ut til å være optimal, og det vurderes hvorvidt natriummetabisulfitt skal fjernes fra preparatet, eventuelt om konsentrasjonen skal reduseres. Det er igangsatt en stabilitetsstudie av fenylefrinpreparatet slik det i dag produseres ved Sykehusapoteket, Rikshospitalet. Stabilitetsstudien er utført frem til og med 6 måneder. Resultatene så langt tyder på at holdbarheten er bedre enn de 6 månedene som man i dag gir preparatet. Studiet vil fortsette etter avslutning av denne oppgaven. Det er samtidig bestemt at sykehusapoteket skal produsere en prøvebatch av fenylefrin 0,1 mg/ml uten natriummetabisulfitt eller andre stabilisatorer. Denne batchen vil bli fulgt opp gjennom en langtidsstabilitetsstudie.

Sammenligning av ulike stabilisatorer (natriummetabisulfitt, dinatriumedetat og askorbinsyre), viste at en høy konsentrasjon av natriummetabisulfitt sammen med en lav konsentrasjon av dinatriumedetat eller askorbinsyre ga best stabilitet. Dinatriumedetat alene gir også gode resultater. Det kan imidlertid se ut til at formuleringen har tilfredsstillende stabilitet slik den foreligger per i dag, eller også helt uten stabilisator. Siden det er ønskelig at parenterale preparater skal inneholde færrest mulig tilsetningsstoffer vil det i første omgang være mest interessant å gå videre med et preparat uten stabilisator.

Gassing av løsninger med nitrogen ble forsøkt for å øke stabiliteten av fenylefrin, og vist å være nødvendig, særlig når løsningen inneholder natriummetabisulfitt. Natriummetabisulfitt ble påvist å ha en oksidativ virkning når løsningen ikke er degasset, noe som innebærer at natriummetabisulfitt vil gi økt degradering av fenylefrin i løsninger som ikke er degasset tilstrekkelig. Løsninger som ikke skal degasses bør derfor ikke inneholde natriummetabisulfitt. Når løsningene ble degasset, var natriummetabisulfitt tilsynelatende uten betydning; det var omtrent like mye gjenværende fenylefrin etter varmebehandling (121 °C, 10 timer) om løsningene inneholdt natriummetabisulfitt eller ikke. Prøver uten stabilisator fikk også forbedret holdbarhet ved degassing.

Videre ble det utført degassingsstudier med nitrogen. Disse ble utført i fysiologisk saltvann (0,9 % (w/v) natriumklorid), da saltkonsentrasjonen kan påvirke løselighet av oksygen i væske. Degassing av 20-40 L fysiologisk saltvann med gasshastighet 6 L/min i 43 minutter var ikke tilstrekkelig til å oppnå en konsentrasjon av løst oksygen som ikke var detekterbar (≈ 0 ppm). Ved produksjon av preparater der lavt oksygeninnhold er kritisk, bør derfor produksjonsvolumet reduseres; 10 L fysiologisk saltvann ble vist å ha et oksygeninnhold på ≈ 0 ppm etter 16 minutters gassing med nitrogen med gasshastighet 6 L/min. Det er også vist at løsninger som det vil være naturlig å produsere i samme beholder (for eksempel 20-40 L i en 50 L ståltank, eller 5-10 L i en 12 L rundkolbe), tilsynelatende trenger like lang degassingstid – uavhengig av væskevolum. Høyest mulig gasshastighet bør benyttes da dette vil gi en raskere og mer fullstendig fjerning av oksygen.

Oppbevaring av dagens preparat på sprøyte viste at det over tid skilles ut et stoff fra sprøyter av merket BD Plastipak. Dette er i utgangspunktet problematisk da

emballasje generelt ikke skal påvirke et farmasøytisk preparat. Bruk av BD Plastipaksprøytene til administrasjon av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* bør derfor revurderes. Den nevnte forurensningen koeluerte med fenylefrin i den benyttede HPLC-metoden. Stabilitetsdata for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ble derfor ikke funnet for denne typen sprøyter. Forsøk utført med sprøytemerkene Terumo og Codan viste at dagens preparat er stabilt ved oppbevaring på disse sprøytene i romtemperatur og 60 % relativ luftfuktighet i minst 14 dager. Terumo var eneste sprøytemerke hvor det ikke ble observert forurensning som skyltes sprøyten. Det anbefales derfor å vurdere et skifte til dette sprøytemerket.

Stabiliteten av fenylefrin i lys ble undersøkt i et bølgelengdeområde fra 310 til 800 nm. Bestråling av fenylefrinløsninger viste at fenylefrin er stabilt ved undersøkelser utført etter ICHs retningslinjer om fotostabilitetstesting. Dette gjelder både i løsninger med og i løsninger uten natriummetabisulfitt oppbevart i rør av polypropylen. Det gjelder også i løsninger av dagens preparat oppbevart i glassampulle. Sammenligning av transmisjonsspektrene for polypropylenrørene benyttet til testing av fotostabilitet og BD Plastipaksprøytene som preparatet trekkes opp i før bruk, viser at rørene benyttet i fotostabilitetsstudien slipper gjennom noe mer lys enn sprøytene. Siden fenylefrinløsninger på rør var stabile, vil preparatet opptrukket på sprøyte også være stabilt. Det samme gjelder for sprøyter av merkene Terumo og Codan. Undersøkelser av fotostabilitet for fenylefrinløsninger med 5-HMF (et nedbrytningsprodukt i glukoseløsninger) indikerer at fenylefrin også vil være stabilt ved lysbestråling i en varmebehandlet glukoseløsning.

FORKORTELSER

A	konstant, kjent som Arrhenius faktor
AAPH	2,2'-Azobis(2-metylpropionamidin)dihydroklorid, et azid tilsatt for å oksidere fenylefrin
Cu(II)	toverdig kobber
CuSO ₄	kobber(II)sulfat
E _a	aktiveringsenergien, den energibarrieren som må overskrides hvis en reaksjon skal skje mellom to molekyler
Fe(II)	toverdig jern
Fe(III)	treverdig jern
FeCl ₃	jern(III)klorid
FeSO ₄ *7 H ₂ O	jern(II)sulfatheptahydrat
5-HMF	5-(hydroksymetyl)-2-furaldehyd 99 %, stoff som danner singlettoksygen
H ₂ O ₂	hydrogenperoksid
HPLC	væskeskromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
ICH	International Conference of Harmonization
k	hastighetskonstant
Dinatrium EDTA	dinatrium etylendiamintetraacetat
Dinatriumedetat	Dinatrium EDTA, EDTA
nm	nanometer
NMB	natriummetabisulfitt
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia, den europeisk farmaskopè
ppm	part per million. 1 ppm = 1 mg/L
r ²	regresjonskoeffisient
R	gasskonstanten (8,314 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
RH	relative humidity, relativ luftfuktighet (%)
RSD	relativt standardavvik (%)
SD	standardavvik
Shelf life	tiden det tar for 10 % av virkestoffet å bli brutt ned defineres ofte som "shelf-life" (t ₉₀)
T	temperatur i grader Kelvin

USP	United States Pharmacopeia
UV	ultrafiolett (bølgelengde 200-400 nm)
v/v	volum/volum (volumprosent)
w/v	vekt/volum
WFI	Water For Injection

1. INNLEDNING

1.1 BAKGRUNN OG HENSIKT

Fenylefrin er et sympatomimetikum som særlig anvendes under operasjoner for å kontrollere pasienters blodtrykk. Stoffet gis intravenøst. Sykehusapoteket ved Rikshospitalet produserer fenylefrin for injeksjon på 5 ml ampuller i en konsentrasjon på 0,1 mg/ml, og preparatet er gitt en holdbarhet på 6 måneder.

Ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet er det som ved andre produksjonsbedrifter et stort fokus på å drive en rasjonell produksjon. Hvert preprat som skal produseres tar tid, og ved å produsere større mengder av et preprat sjeldnere kan man spare både arbeidstid og andre ressurser.

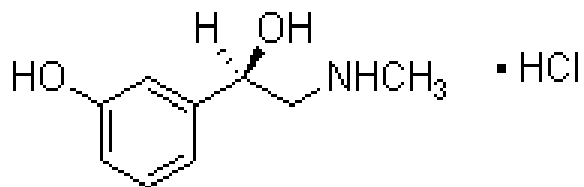
Det produseres et preparat i Sverige med innholdsstoffer tilsvarende det norske preparatet. Det svenske preparatet har en holdbarhetstid på 2 år, noe som indikerer at den reelle holdbarhetstiden til *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er lengre enn dagens 6 måneder. Dersom holdbarhetstiden kan utvides for det norske preparatet vil dette kunne forenkle både produksjon og logistikk. Man vil også kunne redusere kassasjon av preparat utgått på dato både hos apotek og kunder. På bakgrunn av dette, ønsker man å undersøke om *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* kan produseres med lengre holdbarhet enn i dag – enten med dagens formulering, eller med en ny formulering.

Med utgangspunkt i dette er hensikten med oppgaven i første rekke å utrede om dagens formulering av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er optimal, og om formuleringen ikke er optimal – finne frem til forbedringer. For å studere dette må det utvikles en stabilitetsindikerende HPLC-metode for analyse av fenylefrin. I neste omgang er det viktig å dokumentere stabiliteten av fenylefrin i formulering. Det vil være interessant å studere stabiliteten både ved langtidslagring og under bruk – for eksempel når prepratet er oppbevart på sprøyte, og når det er utsatt for lys.

1.2 FENYLEFRIN

Fenylefrin har lavere løselighet enn fenylefrinhydroklorid (Figur 1, side 12), noe som har ført til at det er hydrokloridet som vanligvis benyttes i farmasøytiske preparater.

Fenylefrinhydroklorid er et salt av fenylefrin og vil i vandig løsning foreligge som ionisert fenylefrin da laveste pKa-verdi er 8,9.



Figur 1: Fenylefrinhydroklorid

1.2.1 Farmakologiske egenskaper og bruk

Fenylefrin er et sympatomimetikum og har adrenalinliknende effekt (Apoteket AB, 2006; Martindale, 2007 "Phenylephrine"). Stoffet stimulerer hovedsakelig α_1 -reseptorer og vil etter injeksjon gi perifer vasokonstriksjon og økt arterielt blodtrykk. Stoffet gir også refleksbradykardi. Som injeksjon brukes fenylefrin hovedsakelig for å øke blodtrykket raskt; for eksempel i forbindelse med operasjoner, områdeanestesi, takykardi, myokardiskemi og anafylaktisk sjokk.

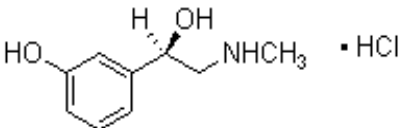
Foruten til injeksjon, foreligger fenylefrinpreparater som brusetabletter, nesedråper, nesespray og øyedråper (Martindale, 2007). Preparater benyttes oralt eller nasalt ved tett nese for avsvelling av neseslimhinnen. Mange orale preparater mot hoste og vanlig forkjølelse inneholder fenylefrin i kombinasjon med andre virkestoffer. Paracetamol er ofte et av disse. Preparatene selges ikke i Norge, men kan kjøpes i blant annet Irland og Australia. Hva gjelder øyemedisinsk bruk, inngår fenylefrin i øyedråper mot mydriasis (full, langvarig utvidelse av pupillen).

1.2.2 Farmakokinetikk

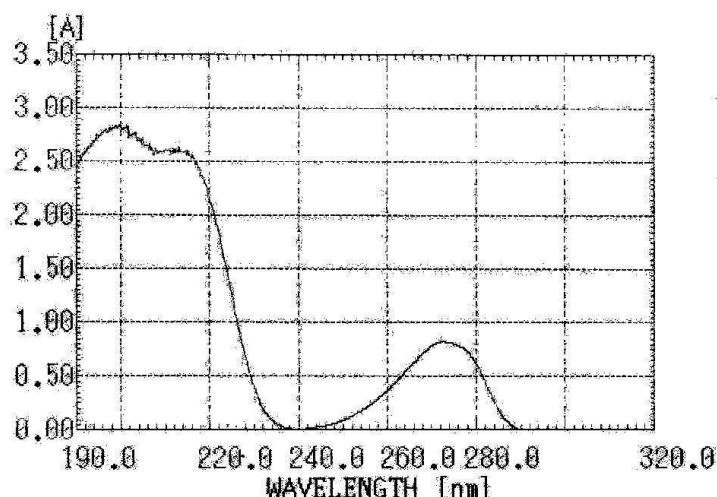
Ved intravenøs injeksjon av fenylefrin tar det ca. 10 til 20 sekunder før effekt oppnås (Martindale, 2007 "Phenylephrine"). En slik injeksjon er aktiv i 5-15 minutter. Ved subkutan eller intramuskulær administrasjon tar det 10-15 minutter før effekt oppnås. Subkutane injeksjoner er aktive i ca. 1 time, mens den intramuskulære injeksjonen varer i opptil 2 timer. Ved applikasjon på overflater vil man kunne få en sekundær systemisk virkning grunnet absorpsjon gjennom mukosa. Fenylefrin har lav oral biotilgjengelighet grunnet ujevn absorpsjon og firstpassmetabolisme av monoamino oksidase i galle og lever.

1.2.3 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for fenylefrin

Tabell 1: Fysikalsk-kjemiske egenskaper for fenylefrin og fenylefrinhydroklorid (Martindale, 2007 "Phenylephrine" og "Phenylephrine hydrochloride")

Fenylefrin	
Kjemisk navn	(1R)-1-(3-Hydroksyfenyl)-2-metylamoetanol
Kjemisk formel	$C_9H_{13}NO_2$
Molekylvekt	167,2 g/mol
Løselighet	Noe løselig i vann og i alkohol
Fenylefrinhydroklorid	
Kjemisk navn	(R)-N-(3,β-dihydroksyfenetyl)-N-metylammoniumklorid (The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979)
Kjemisk formel	$C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$
Struktur	
Molekylvekt	203,7 g/mol
Smeltepunkt	140-145 °C
Løselighet	Løselig i vann og alkohol
Fenylefrin og fenylefrinhydroklorid	
pKa	pKa ₁ : 8,9 (NH ₂ ⁺); pKa ₂ : 10,1 (OH (fenol)) (The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979)
Utseende	Hvite eller nesten hvite krystaller
Lukt	Uten lukt
Oppbevaring	Lufttett emballasje, beskyttet mot lys
UV-spekter	λ _{max} : 273 nm (Figur 2, side 14)

UV-spekteret (Figur 2, side 14) viser fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml i Milli-Q-vann. Spekteret har et absorpsjonsmaksimum ved 272,6 nm og et absorpsjonsminimum ved 239,8 nm. Forbindelsen absorberer ikke stråling over 290 nm.



Figur 2: UV-spekter av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml tatt opp ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, analyseavdelingen

1.2.4 Stabilitet

Stabiliteten av fenylefrin påvirkes av flere faktorer, for eksempel pH, temperatur, konsentrasjon av oppløst oksygen, tilstedeværelse av spormetaller og eksponering for lys.

1.2.4.1 Oksidasjon

En oksidasjonsprosess involverer fjerning av et elektropositivt atom, radikal eller elektron, eller tillegg av et elektronegativt atom eller radikal (Lausier et al., 1976; Florence and Attwood, 1998, s.103-105). Mange oksidasjoner er kjedereaksjoner som løper under påvirkning av molekylært oksygen. En annen type oksidering involverer reversibelt tap av elektroner uten et tillegg av oksygen.

Stabilisering av legemidler mot oksidering bør foregå i alle trinn av produksjonsprosessen. Oksygen i produksjonsbeholder, emballasje og produkt (under produksjon av produkt og ved fylling), bør byttes ut med inert gass, og kontakt mellom legemiddel og spormetaller bør unngås siden disse kan katalysere en oksidasjon. Lagring ved nedsatt temperatur kan vurderes da reaksjonshastigheten senkes med temperaturen. Oksidasjonsprosesser kan dessuten normalt motvirkes ved å tilsette en liten mengde av en antioksidant (Nema et al., 2002). Antioksidanter er videre omtalt i kapittel 1.3.2 Hjelpstoffer, side 23.

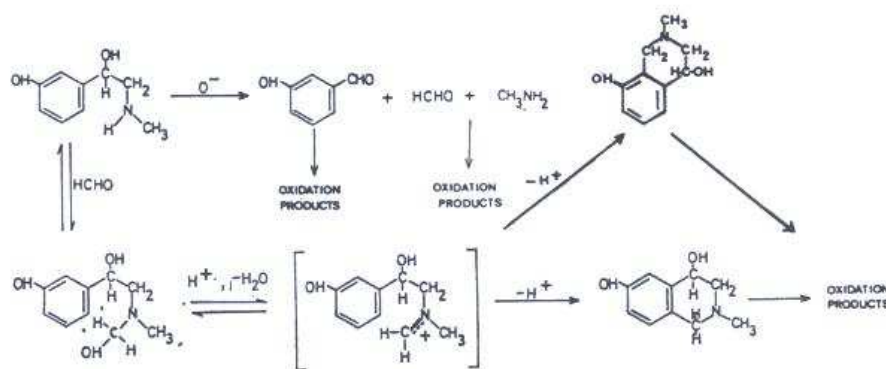
Wahlquist rapporterte om gulfarging av løsninger som inneholdt fenylefrinhydroklorid når de ble oppbevart i romtemperatur over ett år, særlig om

luften i primæremballasjen ikke ble byttet ut med nitrogen eller om løsningen ikke inneholdt natriummetabisulfitt (das Gupta and Mosier, 1972). Tilstedeværelse av metallioner ga økt misfarging, selv om graden av misfarging ikke direkte sa noe om nedbrytningen av fenylefrin.

Kobber, magnesium og jern er alle spesifisert som metallioner som katalyserer degraderingen av fenylefrin (Gaglia Jr., 1972).

Oksidering ser ut til å være det største problemet hva gjelder stabilitet av fenylefrin i løsning. Lausier et. al (1976) sammenlignet nitrogengassing, tilsetning av chelator og en spesiell type filtrering som metoder for å motvirke oksidering av fenylefrin. Det ble konkludert med at metodene hadde effekt, men at mengden oksygen som skal til for å starte en autooksidasjon er så liten at ingen av dem er ideelle. Samtlige metoder gir imidlertid noe beskyttelse og er tilstrekkelige så lenge man tar hensyn til autooksidasjonen ved fastsettelse av holdbarhetsdato.

Fire degraderingsprodukter er karakterisert for oksidasjonsprosessen. Hovedproduktene er 1,2,3,4-tetrahydro-4,6-dihydroksy-2-metylisouinolin og 1,2,3,4-tetrahydro-4,8-dihydroksy-2-metylisouinolin, mens det dannes mindre mengder 2-metylisouinolin-6(2H)-on og 2-metylisouinolin-8(2H)-on. Oksidasjonsveien er foreslått (Figur 3) (Millard et al., 1973).



Figur 3: Foreslått oksidasjonsvei for fenylefrin i vandig løsning (Millard, Priaux et al. 1973)

1.2.4.2 pH

Det er godt dokumentert at pH har stor betydning for stabilitet av fenylefrin (das Gupta and Mosier, 1972; Gaglia Jr., 1972; The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979; Al Taii et al., 1982; das Gupta

and Parasrampur, 1987; Trissel, 1994 "Phenylephrine HCL"; das Gupta, 2004; Marin and Barbas, 2004). Fenylefrin angis å være stabil i formuleringer med pH under 7, slik den er i *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*. Ved pH 7 eller lavere vil den sekundære aminogruppen (pK_a : 8,9) og fenolgruppen (pK_{a2} : 10,1) i fenylefrin være vesentlig protonert. Ved pH over 7 vil degradering finne sted (Weber, 1969; Gaglia Jr., 1972; Lausier et al., 1976). Schou og Rhodes (das Gupta and Mosier, 1972) skriver imidlertid at fenylefrin vil være stabilt ved pH under 1; ved pH over 1 bør løsningen stabiliseres med natriummetabilsulfitt 1 mg/ml. I praksis vil dette tilsi at alle løsninger av fenylefrin som skal injiseres må stabiliseres, da en injeksjon bør ha en pH nær fysiologisk pH (Chapman, 2004).

Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske som produseres ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet inneholder natriummetabisulfitt i en konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Det er krav om at pH-verdien i preparatet skal ligge innenfor et pH-intervall på 3,0–4,0 (Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, 2007). USP anbefaler en pH på mellom 3,0–6,5 (United States Pharmacopoeia 30, 2007 "Phenylephrine hydrochloride injection").

1.2.4.3 Temperatur

Akselererte stabilitetsstudier av legemidler utføres ofte ved å lagre stoffer og preparater ved høyere temperatur. Slik lagring kan gi en nyttig indikasjon på stabilitet ved romtemperatur. Arrheniuslikningen (Likning 1, side 17) viser sammenhengen mellom hastighetskonstant og temperatur for en reaksjon; reaksjonshastigheten øker med temperaturen (Florence and Attwood, 1998, s.130). Bruk av likningen forutsetter at reaksjonsorden ikke endres med økning i temperatur. Høy tilførsel av energi i form økt temperatur kan medføre at en høy aktiveringsenergi som vanligvis ville hindre en reaksjon i å forløpe ved romtemperatur, vil kunne overgå, og nye reaksjoner kan trå i kraft. Dette kan gi et galt bilde av hva som ville forekommet i løsningen ved romtemperatur. Det er derfor nødvendig å gjøre ekstra studier ved normale lagringsbetingelser for aktuelle formuleringer. Ved bruk av forhøyet temperatur vil man imidlertid kunne få en indikasjon på hva som vil skje ved normal oppbevaring, slik at antallet formuleringer som settes til langtidsstabilitetsforsøk vil kunne begrenses. Arrhenius likning gjelder ikke hvis nedbrytning er avhengig av for eksempel diffusjonsprosesser, fotokjemisk nedbrytning, fryseprosesser og kontaminasjon av mikroorganismer (enzymatiske reaksjoner).

Likning 1: Arrhenius likning

$$\text{Log } k = \text{log } A - E_a / (2,303RT)$$

k = hastighetskonstant for reaksjonen

A = Frekvensfaktor

E_a = aktiveringsenergi; energibarrieren som må overstiges for at en reaksjon skal gå

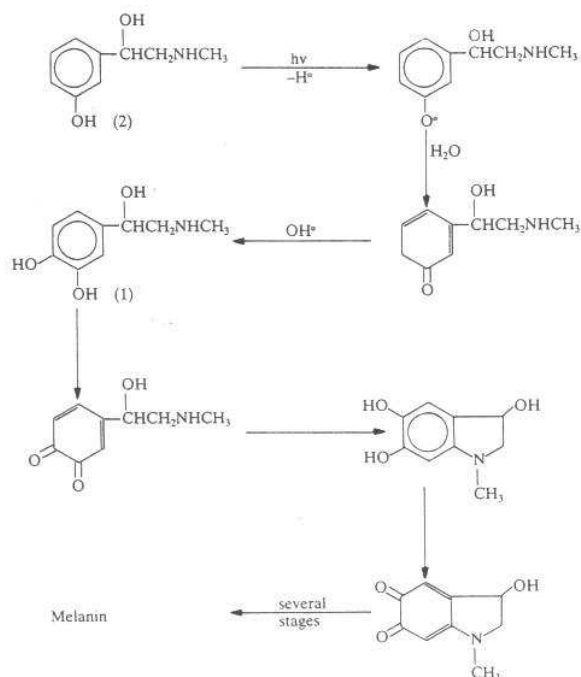
R = gasskonstant (8,314 J/mol*K)

T = temperatur i grader Kelvin (absolutt temperatur)

En løsning av fenylefrinhydroklorid (2,5 mg/ml) i fysiologisk saltvann, ble vist å være stabil i 84 dager ved 60 °C, og det ble konkludert med at løsningen ville være stabil i 6 måneder ved oppbevaring i romtemperatur (Weber, 1970). Det samme gjaldt en løsning som kun inneholdt fenylefrinhydroklorid (2,5 mg/ml) og sterilt vann. Nevnte løsninger inneholdt 25 ganger mer fenylefrin enn preparatet som produseres ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet.

1.2.4.4 Lys

Lys er energi og kan påvirke legemidlers stabilitet. UV-stråler med kortere bølgelengde enn ca. 310 nm trenger man ikke ta hensyn til i et innendørs sykehusmiljø siden denne strålingen filtreres bort av atmosfære og vindusglass. Lys med bølgelengde over 310 nm er imidlertid interessant da det kan trenge gjennom vindusglass. Lysrør vil dessuten avgi lys med bølgelengde over ca. 360 nm. Det er rapportert at bestråling av en fenylefrinløsning med UV-stråler (uspesifisert bølgelengde eller angitt til 303-400 nm) gir degradering av fenylefrin til adrenalin (Figur 4, side 18) (Gaglia Jr., 1972; Al Taii et al., 1982). UV-spekteret til fenylefrin viser at virkestoffet ikke absorberer lys ved bølgelengder over 290 nm (Figur 2, side 14). I et sykehusmiljø er det med andre ord ikke lys som påvirker fenylefrin direkte. Man kan imidlertid ikke utelukke en indirekte påvirkning.



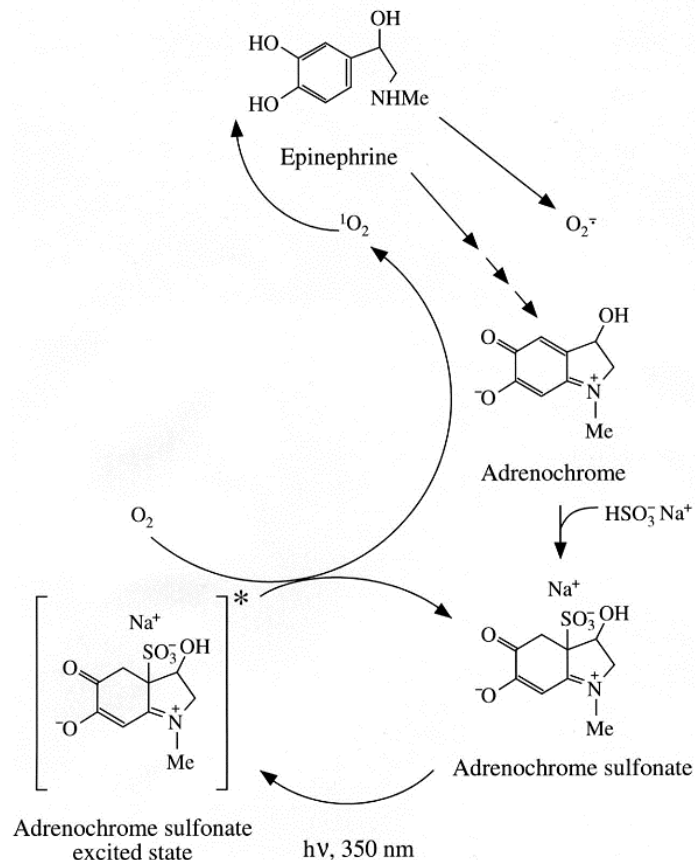
Figur 4: Bestråling av fenylefrin (2) med UV-lys fra 303 til 400 nm gir dannelse av adrenalin (1) og melanin (Al Taii, Stanford et al. 1982)

Adrenalin har en OH-gruppe mer enn fenylefrin (Figur 5). Dette gjør adrenalin til et katekolamin.



Figur 5: Adrenalin og fenylefrin, strukturformel (Millard, Prialux et al. 1973)

Det er kjent at adrenalin og andre katekolaminer kan påvirkes av lys når de foreligger i løsning sammen med bisulfitt (Figur 6, side 19). Denne reaksjonen er imidlertid ikke dokumentert for fenylefrin.



Figur 6: Oksygenavhengig fotodegradering av adrenalin forårsaket av adrenokromsulfonat (Brustugun, 2005). (Epinephrine: adrenalin, adrenochrome: adrenokrom, adrenochrome sulfonate/adrenochrome sulfonate excited state: adrenokromsulfonat/ eksitert adrenokromsulfonat).

Degradering av adrenalin vil kunne gi adrenokrom (Brustugun, 2005). Adrenokrom kan i nærvær av bisulfitt raskt danne adrenokromsulfonat. Under påvirkning av UV-stråling med bølglengde ca. 350 nm eksiteres adrenokromsulfonat. Eksitert adrenokromsulfonat kan videre reagere med oksygen og slik danne singlettoksygen. Singlettoksygen er svært reaktivt og kan reagere med, og bryte ned, mange stoffer. Om fenylefrin brytes ned til adrenalin og blir gjenstand for nedbrytning etter dette mønsteret er ukjent. Det er imidlertid rapportert at fenylefrin er en meget effektiv deaktivator av singlettoksygen (Massad et al., 2005). Fenylefrin forbrukes ikke i prosessen. Det kan dermed se ut til at fenylefrin er mer stabilt overfor singlettoksygen enn adrenalin. En eventuell nedbrytning av fenylefrin ved bestråling med lys med en bølglengde på ca. 350 nm vil sannsynligvis ikke skyldes nedbrytningsveien som gjelder for adrenalin.

1.2.5 Analyse

Det er tidligere utviklet flere analysemetoder for deteksjon av fenylefrin. Mange baserer seg på teknikker som ikke er førstevalg i dag. Fokuset de senere år har særlig vært på utvikling av HPLC-metoder der fenylefrin kan skilles fra andre stoffer som inngår i formuleringen (Senyuva and Ozden, 2002; Garcia et al., 2003; Marin and Barbas, 2004; Olmo et al., 2005). Det ser ikke ut til å foreligge en ferdig utviklet og validert analysemetode som benytter dagens kolonnetyper og i tillegg passer til problemstillingen i denne oppgaven. Metodene som er laget tidligere kan imidlertid gi nyttig informasjon ved valget av kolonne og mobilfasesammensetning. I oppgaven skal det utvikles en metode som skiller fenylefrin fra degraderingsprodukter av fenylefrin.

Egnet deteksjonsbølgelengde for fenylefrinhydroklorid i vann er 273 nm da stoffet har et absorpsjonsmaksimum ved denne bølgelengden (Figur 2, side 14). 273 nm er dessuten benyttet i flere andre analysemetoder (Shotton and Priaux, 1974; The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979). Under utvikling av HPLC-metoden ble det kontrollert at degraderingsprodukter (Tabell 34, side 64) og aktuelle hjelpestoffer i injeksjonen (resultater ikke vist) ikke absorberte ultrafiolett stråling ved denne bølgelengden.

Ved gjennomgang av tidligere analyser utført ved hjelp av HPLC, ser man at det i stor grad er benyttet C₁₈- og C₈-kolonner (Ghanekar and das Gupta, 1978; Schieffer and Hughes, 1983; Al-Kaysi et al., 1985; das Gupta and Parasrampur, 1987). Disse kolonnene er ofte førstevalget ved utarbeidelse av nye analyser. Mange av kolonnene i de nevnte artiklene er pakket på analyselaboratoriene (Schieffer and Hughes, 1983; das Gupta and Parasrampur, 1987). I dagens laboratorier kjøpes kolonner vanligvis ferdig pakket for å unngå variasjoner. Mange av kolonnene i tidligere analyser har ukjent eller stor partikkelstørrelse (> 5 µm) (Ghanekar and das Gupta, 1978; Schieffer and Hughes, 1983; Al-Kaysi et al., 1985; das Gupta and Parasrampur, 1987). Vanlig partikkelstørrelse er i dag 5 µm eller mindre. De fleste kolonnene som er benyttet under tidligere studier er ikke lengre å få i handelen.

Hva gjelder mobilfasen, var 40 % metanol høyeste andel organisk løsningsmiddel som ble benyttet i eldre metoder. De fleste metodene benytter en ionepardanner i mobilfasen. Et eksempel er natriumheptansulfonat (Ghanekar and das Gupta, 1978).

Bruk av ionepardanner vil kunne gi bedre retensjon og redusere en eventuell haledannelse. Haledannelse oppstår ofte ved analyse av ioniserte stoffer. I en av metodene er det også benyttet fosfatbuffer for å oppnå stabil pH i mobilfasen (das Gupta and Parasrampur, 1987).

En utfordring ved utvikling av HPLC-metoder er å oppnå tilstrekkelig god selektivitet. Endret selektivitet uten særlig forskyvning i elueringstid kan oppnås ved bruk av en organisk modifikator fra en annen selektivitetsgruppe (Snyder, 1974). Som eksempel vil acetonitril ha bedre protondonoregenskaper enn metanol, i tillegg til at acetonitril også vil være mer polart. Det kan derfor bli aktuelt å bytte ut noe metanol, som er benyttet i mange av analysene, med acetonitril for å oppnå bedre resultater. Det blir dessuten aktuelt å prøve en lang kolonne (25 cm) for å bedre selektiviteten.

1.3 FORMULERING AV INJEKSJONER

Den Europeiske Farmakopè oppgir følgende: "Parenteral preparations are sterile preparations intended for administration by injection, infusion, or implantation into the human or animal body" (European Pharmacopeia 5th, 2007 "Parenteral preparations"). En løsning til injeksjon må være steril, pyrogenfri og fri for partikler. Råvarene i formuleringen må ha høy grad av renhet og dessuten tåle sluttsterilisering eller være sterile og benyttes i aseptisk produksjon. Injeksjoner bør om mulig være isotone med blod, men kan være hypertone. Injeksjoner skal derimot ikke være hypotone.

Det stilles mange krav til valg av hjelpestoffer i parenterale preparater, og det bør ikke tilsettes andre stoffer enn de som er strengt nødvendige. Parenteralia kan dermed sies å være en type formulering som bør inneholde minst mulig. Formuleringskrav til parenteralia vil avhenge av administrasjonsveien. Det vil være strengest krav til innholdsstoffer i intraspinale og epidurale preparater, der for eksempel antimikrobielle midler ikke kan tilsettes (European Pharmacopeia 5th, 2007). Kravene for intravenøse injeksjoner er ikke fullt så strenge, mens størst frihet finnes for preparater som skal injiseres subkutan og intramuskulært. *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er beregnet på intravenøs administrasjon. Preparatet inneholder virkestoff, isotoniregulerende middel og antioksidant. Stoffene er løst i sterilt vann.

Selv om det er strenge krav til hvilke stoffer som tillates i en parenteral formulering, er dette ingen garanti for at et nytt preparat er trygt når tilsetningsstoffene eksempelvis kombineres på andre måter enn før, og/eller når de brukes sammen med et nytt virkestoff (Nema et al., 2002). Det er alltid mulig at hjelpestoffer i ny kombinasjon, eller kombinert med nye virkestoffer, kan gi uforutsett potensering eller synergistisk toksisk effekt.

1.3.1 Rikshospitalets fenylefrinpreparat

Fenylefrinpreparater for injeksjon lages både i Norge og i Sverige. I Norge produseres *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* av Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, mens i Sverige produseres *Fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml ATL* av Apoteket AB.

Det norske preparatet inneholder fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml i ”vann til injeksjon i bulk” (WFI). Natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml tilsettes som antioksidant. Preparatet gjøres isotont ved bruk av natriumklorid (Tabell 2).

Tabell 2: Spesifikasjon for dagens norske preparat (Vedlegg 1: Hovedforskrift for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* per 15.mars 2007, side 106)

Komponent (pr.ml)	Hovedfunksjon
Fenylefrinhydroklorid 0,1 mg	Virkestoff
Natriummetabisulfitt 0,5 mg	Antioksidant
Natriumklorid 8,6 mg	Isotoniregulator
Sterilt vann q.s.	Løsningsmiddel
Nitrogengass (under produksjon)	Fjerning av oksygen for å bremse oksidasjon (Nema et al., 2002).
pH:	3,0-4,0 (Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, 2007)
Oppbevaringsbetingelser:	Beskyttet mot lys, romtemperatur
Holdbarhetstid:	6 måneder
Navn:	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>

Vann til injeksjon i bulk (WFI) gjennomgasses med nitrogen i 10 minutter før blanding med virkestoff og hjelpestoffer (Vedlegg 1: Hovedforskrift for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* per 15.mars 2007, side 106). Etter blanding gasses løsningen igjen i 10 minutter, mellomkolben i dispenseringsprosessen gasses i 2 minutter og sterile glassampuller gasses med nitrogen før injeksjonsvæsken dispenseres. Metoden som benyttes i dag er ikke standardisert da gasshastigheten ikke er kjent. Preparatet har en pH 3,0-4,0.

Ved sammenligning av spesifikasjonen til det norske og det svenske preparatet fremgår det at de samme stoffene inngår i samme mengde (Tabell 2 og Tabell 3). Det norske preparatet har en holdbarhet på 6 måneder, mens det svenske preparatet har holdbarhet 2 år. pH er nesten lik i de to preparatene og begge er oppgitt å skulle oppbevares beskyttet mot lys. Årsaken til forskjell i holdbarhetstid er ikke kjent. Det kan være at det svenske preparatet produseres på en annen måte. En annen mulighet er at det norske preparatet i utgangspunktet har god nok holdbarhet. Produksjonsbetingelsene ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet tilfredsstiller krav som gir mulighet til å sette en maksimumsholdbarhet på 2 år på denne typen preparater. De innehar også nødvendig produksjonstillatelse om dette skulle bli aktuelt. Stabilitet av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er ikke tidligere dokumentert ved Sykehusapoteket, Rikshospitalet, og skal undersøkes i oppgaven.

Tabell 3: Spesifikasjon for dagens svenske preparat (*Apoteket AB, 2006*)

Komponent (pr.ml)	Hovedfunksjon
Fenylefrinhydroklorid 0,1 mg	Virkestoff
Natriummetabisulfitt 0,5 mg	Antioksidant
Natriumklorid 8,6 mg	Isotoniregulator
Sterilt vann q.s.	Løsningsmiddel
Nitrogengass (under produksjon)	Ikke kjent
Holdbarhetstid:	2 år
Oppbevaringsbetingelser:	Beskyttet mot lys, romtemperatur
pH:	3,0-4,5
Navn:	<i>Fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml ATL</i>

1.3.2 Hjelpestoffer

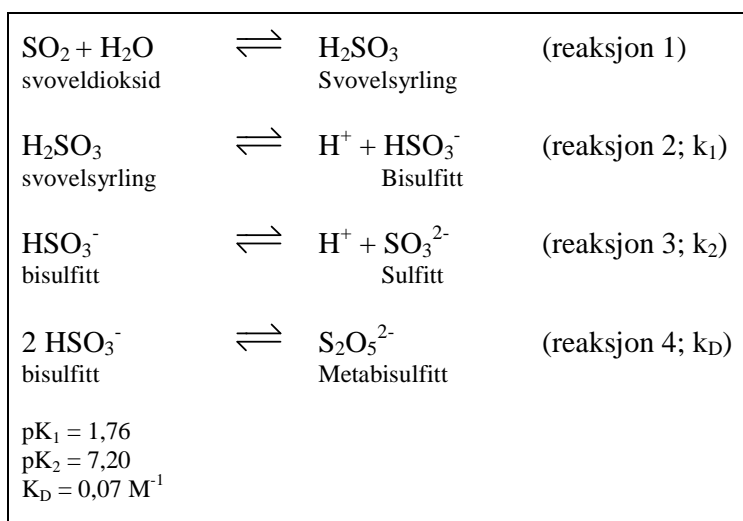
Det er strenge krav til hjelpestoffer som kan tilsettes en intravenøs injeksjon, både hva gjelder renhet og ikke minst typen stoffer. Som tidligere nevnt, ønskes et minimum av hjelpestoffer i preparatet. Hjelpestoffer og hjelpestoffgrupper som allerede finnes i preparatet eller som vil forsøkes tilsatt som stabilisatorer i denne oppgaven, vil omtales nærmere i dette kapitlet.

Antioksidanter

Antioksidanter kan deles i følgende tre grupper som følge av virkningsmekanismen (Nema et al., 2002):

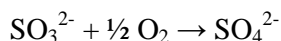
- Ekte antioksidanter: kjedeterminerende antioksidanter som virker gjennom direkte reaksjon med frie radikaler
- Reduksjonsmidler: stoffer som oksideres før legemidlet grunnet sitt lave redokspotensial (eks. askorbinsyre)
- Antioksidantsynergister: stoffer som forsterker effekten av antioksidanter (eks. dinatriumedetat)

Natriummetabisulfitt er tilsatt *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* for å beskytte virkestoffet mot oksidasjon. Natriummetabisulfitt er et salt av svovelsyring (H_2SO_3). I vandig løsning vil natriummetabisulfitt umiddelbart dekomponere til bisulfitt (Roos, 1993). Stoffet vil foreligge i form av en likevekt mellom metabisulfitt ($\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$), bisulfitt (HSO_3^-) og sulfitt (SO_3^{2-}) (Figur 7) (Connors, 1986), og pH vil avgjøre hvilken form som vil dominere. Likevektene gjør at både metabisulfitt-, bisulfitt- og sulfittsalter kan benyttes som antioksidanter. Sulfitter er den langt største gruppen av antioksidanter som anvendes i parenteralia og benyttes både i form av natrium- og kaliumsalter.



Figur 7: Syre-baselikevekter og dimerisering i vandig bisulfittløsning (Connors, 1986)

Effektiviteten av bisulfitt som antioksidant beror på hvor lett stoffet oksideres sammenlignet legemidlet det skal beskytte (Schroeter, 1961). Oksidasjonen av sulfitt og bisulfitt gir sulfat som produkt, og for sulfitt er følgende generelle formel gitt:



Oksidasjonsreaksjonene er foreslått å foregå via flere ulike delreaksjoner der radikaler som hydroksyl (OH^\bullet), superoksid (O_2^\bullet) og det nøytrale bisulfitradikalet (HSO_3^\bullet) er involvert.

Natriummetabisulfitt har enkelte tilleggseffekter; det beskytter fenylefrinpreparater mot degradering forårsaket av sollys (Gaglia Jr., 1972), og er nevnt å ha antimikrobiell effekt. Den antimikrobielle virkningen er tilskrevet svoveldioksid og svovelsyrning, og gjør at stoffet er effektivt mot de fleste bakterier, sopp og gjær (Roos, 1993; Fielder and Fielder, 2002 "Sodium pyrosulfite"; Stewart, 2003). Preparatet fra Sykehusapoteket ved Rikshospitalet produseres i sterilt miljø og er autoklavert. Injeksjonsvæsken oppbevares dessuten i lukkede glassampuller som er beregnet til engangsbruk. Den antimikrobielle effekten har derfor ikke betydning for valg av antioksidant i *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*. Det vil dessuten være lite av de antimikrobielle stoffene til stede siden pH i preparatet skal være 3,0-4,0 og pK_1 er 1,76; ved en normal pH i preparatet vil over 99 % være på bisulfittformen av stoffet.

Normalkonsentrasjon av natriummetabisulfitt i parenterale preparater er 0,1-10 mg/ml (0,01-1 % (w/v)) (Nema et al., 2002; Stewart, 2003). Rikshospitalets fenylefrinpreparat inneholder 0,5 mg/ml (0,05 %) natriummetabisulfitt. Vandige løsninger av natriummetabisulfitt som utsettes for luft vil brytes ned, særlig ved oppvarming. Løsninger som skal autoklaveres bør av den grunn fylles i emballasje der luften er byttet ut med inert gass, for eksempel nitrogen (Stewart, 2003).

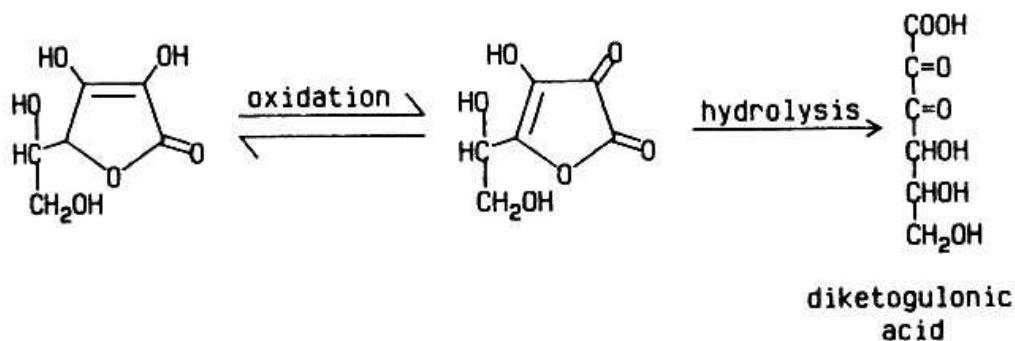
Det finnes atskillige rapporter om uforlikelighet og toksisitet som skyldes natriummetabisulfitt (Roos, 1993; Nema et al., 2002). Kvalme, diarè, kløe, hevelse, bronkospasme, anafylaktisk sjokk, tap av bevissthet og død hos følsomme personer er alle tilstander som er rapportert etter behandling med preparater som inneholdt natriummetabisulfitt. Hyppighet av uønskede reaksjoner er større hos astmatikere (Roos, 1993). Det er et særlig ønske om å unngå natriummetabisulfitt i parenterale

preparater (Nema et al., 2002). Om antioksidanten likevel må inkluderes i formuleringen skal konsentrasjonen være berettiget med tanke på effektivitet og sikkerhet. Det oppfordres til å prøve nitrogengass alene før en eventuell antioksidant tilsettes. Denne oppgaven tar sikte på å utrede om natriummetabisulfitt er nødvendig for stabilisering av fenylefrin, samt å finne en gunstig konsentrasjon av natriummetabisulfitt om stoffet er påkrevd.

Askorbinsyre benyttes som antioksidant i parenteralia, men har også chelator- og bufferegenskaper (Nema et al., 2002). Vanlig konsentrasjonsområde er 1-48 mg/ml (0,1-4,8 % (w/v)). Inkompatibilitet mellom fenylefrin og askorbinsyre har vært foreslått tidligere (Nema et al., 2002; Stodghill, 2003). Ingen bivirkninger er rapportert som følge av askorbinsyre benyttet i farmasøytiske preparater i de mengdene som benyttes for å oppnå den antioksidierende effekten (Stodghill, 2003).

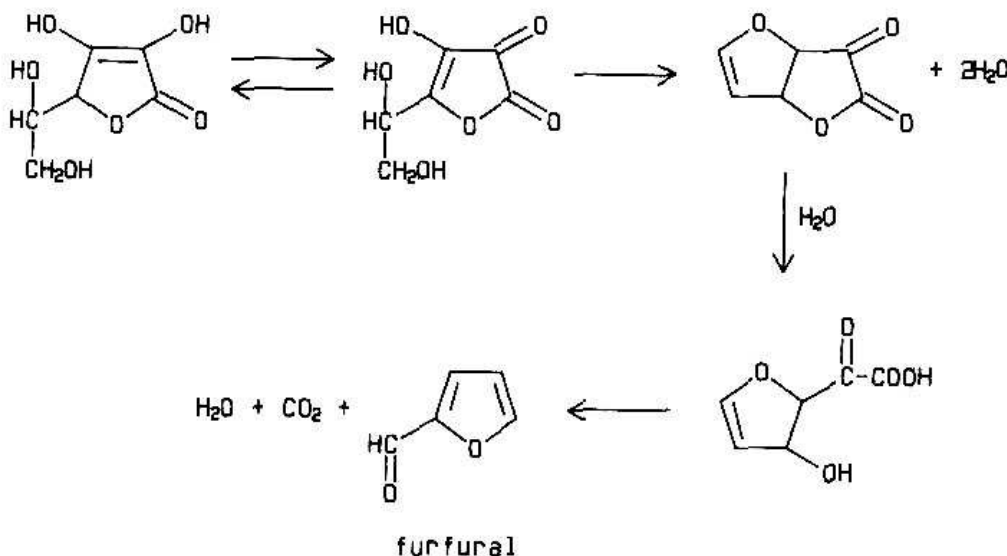
Antioksidanter som er reduserende stoffer kan også fungere som oksidanter, og dermed fremme en oksidering fremfor å bremse den (Wikipedia contributors, 2007). Askorbinsyre er nevnt spesielt som et eksempel der dette kan forekomme. Hvilke effekter som dominerer avhenger av flere faktorer som for eksempel konsentrasjon, spormetaller og mengden oppløst oksygen.

Askorbinsyre er et reduksjonsmiddel og vil oksideres før legemiddelet grunnet sitt lave redokspotensial. Under aerobe forhold vil askorbinsyre oksideres før det videre degraderes hydrolyttisk (Figur 8, side 27) (Connors, 1986). Det er den første reaksjonen som gjør at askorbinsyre benyttes som en antioksidant. Oksidasjonshastigheten avhenger av pH og oksygenkonsentrasjon og katalyseres av metallioner, særlig Cu^{2+} og Fe^{3+} .



Figur 8: Degradering av askorbinsyre under aerobe forhold (Connors, 1986).
(Oxidation=oksidasjon, hydrolysis=hydrolyse).

Under anaerobe forhold vil askorbinsyre degraderes gjennom dehydrering og hydrolyse og gi blant annet karbondioksid (CO_2) (Connors, 1986). Reaksjonshastigheten vil i likhet med under aerobe forhold, være høyest ved en pH på ca. 4.

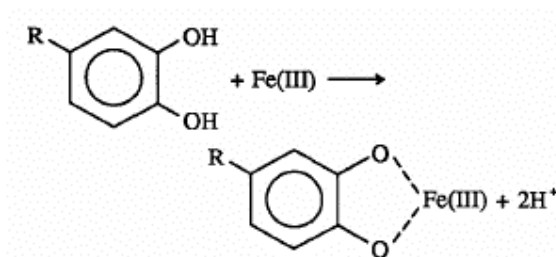


Figur 9: Anaerob degradering av askorbinsyre (Connors, 1986).

Chelatorer

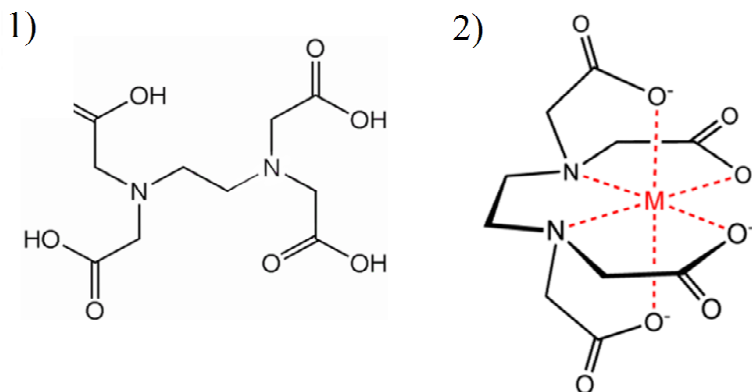
Mange oksidasjonsprosesser kan katalyseres av spormetaller. Spormetallene kan stamme fra råvarer eller vann. Man trodde tidligere at mange reaksjoner var såkalte "autoksidasjoner" (en tilsynelatende ikke-katalysert oksidasjon av en substans utsatt

for oksygen fra luft) (Miller et al., 1990). Det er imidlertid lite sannsynlig at molekylært oksygen direkte oksiderer biomolekyler, som for eksempel katekolaminer, effektivt. Dette fordi oksygen i grunntilstand er en triplett (ytte elektroner i grunntilstand har parallell spinn), mens de aller fleste andre molekyler er singletter (ytte elektroner i grunntilstand har antiparallell spinn). En reaksjon vil altså være spinn-forbudt. Mange spormetaller finnes imidlertid i flere spinntilstander og kan på grunn av dette medvirke til å oppheve spinn-forbudet. Effekten av spormetaller blir særlig virkningsfull siden mange biomolekyler binder spormetaller (Figur 10). Chelatorer er forgrenede molekyler som virker ved å legge seg rundt metallionene. De hindrer dermed at spormetallene kan katalysere reaksjonene like effektivt (Figur 11, side 29). Katalysering av degraderingsreaksjoner ved tilstedeværelse av spormetaller er tidligere rapportert for fenylefrin (se 1.2.4.1 Oksidasjon, side 14).



Figur 10: Chelatering av treverdig jern (Fe(III)) til katekoldelen av et katekolamin (for eksempel adrenalin eller dopamin) (Miller et al., 1990)

Dinatrium EDTA (dinatriumedetat) kompleksbinder spormetaller, og kan som tidligere nevnt dermed hemme en oksidasjon. Eksempelvis vil reduksjonspotensialet til spormetallparet treverdig- og toverdig jern (Fe(III)/Fe(II)) senkes med omtrent 0,6 volt når det foreligger som et chelat (EDTA:Fe(III)/EDTA:Fe(II)) (struktur 2 i Figur 11, side 29) sammenlignet med når det foreligger på fri form (struktur 1 i Figur 11) (Miller et al., 1990).



Figur 11: Strukturformel av edetat (1) og chelat av metall (M) og edetat (2)

Dinatriumedetat kan sammen med andre antioksidanter ha en synergistisk effekt (Nema et al., 2002; Owen, 2003; Martindale, 2007 "Sodium edetate"). Vanlig konsentrasjonsområde av dinatriumedetat er 0,05-1,1 mg/ml (0,005-0,11 % (w/v) (Nema et al., 2002; Owen, 2003).

Isotoniregulerende middel

Natriumklorid 0,9 % (w/v) er isotont med blod. Natriumklorid er den mest brukte isotoniregulatoren. Mengden natriumklorid justeres i forhold til andre stoffer i formuleringen som også påvirker isotonien.

Glukose 5 % (w/v) er isoton med blod. Glukoseløsningen har gjerne litt lavere pH enn natriumkloridløsningen. Denne isotoniregulatoren blir per i dag ikke benyttet sammen med *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*, selv om det sannsynligvis har blitt gjort tidligere. Under produksjon av glukose 5 % (w/v) dannes et stoff (5-HMF) som er kjent å påvirke fotostabiliteten av katekolaminer. Siden fenylefrin har en struktur som ligner katekolaminenes struktur (Figur 5, side 18) skal innvirkningen av degraderingsproduktet undersøkes ved fotostabilitetsstudier av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* (3.5.2.2 Lysstabilitet i prøver med ulike mengder 5-HMF, side 58).

Inerte gasser

Nitrogen benyttes som en inert gass for å fjerne oksygen fra løsninger og emballasje som inneholder oksiderbare substanser (Martindale, 2007 "Nitrogen"). Nitrogen er den mest brukte inerte gassen. Det er oppgitt å ta minst 10 minutter å nå et oksygennivå på 0 ppm i 1 liter vann ved bruk av gasshastighet 4 L/min og en pasteurpipette (Roos, 1993).

Ved en temperatur på 22 °C og en høyde over havet på 100 meter (tilsvarende høyden over havet der degassingsforsøkene er utført i denne oppgaven) vil rent vann mettet med oksygen inneholde en konsentrasjon av løst oksygen på 8,6 ppm. Løseligheten av gasser i væsker avtar ved økende temperatur. Generelt vil dessuten tilsetning av salter i vannet føre til en utsalting av gassen. En løsning av 0,9 % (w/v) natriumklorid skal dermed inneholde mindre oksygen enn samme volum vann uten tilsatt salt.

Metoden for degassing ønskes standardisert under hovedfaget. Det vil utføres stabilitetstester for å se på degassingens innvirkning på holdbarheten av produktet.

2. EKSPERIMENTELT

2.1 STOFFLISTE

- a) 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride 97 %, Aldrich, Steinheim, Tyskland, Lot nr. 1112OJC-505
- b) Acetonitril HPLC grade, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skottland, K.nr. 610306, 702303, 703304 og 707303
- c) Adrenalin tartrat, Boehringer Ingelheim, Krefeld, Tyskland, K. nr. 610305
- d) Askorbinsyre, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 512005
- e) Dinatriumedetat pyrogenprøvd, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 605001
- f) *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, batch nr. 601116 og 703306
- g) Phenylephrine hydrochloride, Unikem, København, Danmark, K.nr. 509021 og 608004
- h) Fosforsyre 1,0 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 610203
- i) Hydrogenperoksid 30 %, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 504307
- j) 5-hydroksymetyl-2-furaldehyd 99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, Lot: S41574-177
- k) Jern(II)sulfatheptahydrat, Merck, Darmstadt, Tyskland, K.nr. 609303
- l) Jern(III)klorid, VWR, West Chester, Pennsylvania, K.nr. 408313
- m) Kaliumdihydrogenfosfat, Merck, Darmstadt, Tyskland, K.nr. 610303
- n) Kaliumhydroksid 5 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 308201
- o) Kobber(II)sulfat, vannfri, Merck, Darmstadt, Tyskland, K.nr. 606304
- p) Metanol HPLC grade, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Skottland, K.nr. 609306, 612309, 702305, 705305 og 708301
- q) Milli-Q-vann, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge
- r) Natrium-1-heptansulfonat, Sigma, USA, K.nr. 707301, 611301, 701311 og 703301
- s) Natriumhydroksid 0,5 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 601202
- t) Natriumklorid, Apotekproduksjon AS, Oslo, Norge, K.nr. 705306

- u) Natriumklorid, Merck, Darmstadt, Tyskland, K.nr. 210302
- v) Natriummetabisulfitt, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 612012
- w) Nitrogen: Trace Nitrogen 5.0 HiQ®, AGA, Oslo, Norge
- x) Saltsyre 0,1 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 607201

2.2 INSTRUMENTER OG UTSTYR

a) **Analysevekt**

APPARATUR:

Sartorius GmbH Analytic, A210P, Goettingen, Tyskland

BETINGELSER:

Veieområde: 0,01-212 g

Minste veibare mengde: 0,01 g

*feilbidrag fra vekt: 0,2 mg

*reproduserbarhet: 0,1 mg

b) **Autoklav**

APPARATUR:

Vannautoklav E-10127, Matachana, Barcelona, Spania

BETINGELSER:

Temperatur: 121 °C

Tid: Program 2: 16 minutter

Program 5: 5 timer, kjøres to ganger for å få 10 timer
varmebehandling

c) **Filter for filtrering av luft, 0,2 µm**

Millex-FG, Millipore, Carrigwohill, Co. Cork, Irland

d) **Filter for filtrering av væske, 5 µm**

Sterifix Pury, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Tyskland

e) **Fryseboks**

APPARATUR:

Sanyo medical freezer, MDF-435, Osaka, Japan

BETINGELSER:

Temperatur: < -20 °C

Temperaturdokumentasjon: Malvern overvåkningssystem, TE051F1

f) **HPLC, SYSTEM 2:**

Systemet består av følgende utstyr der alle enhetene er fra Shimadzu corp., Kyoto, Japan:

Autoinjektor:	Shimadzu SIL-10A
Degasser:	Shimadzu GT-104
Detektor:	Shimadzu SPD-M10AVP DiodeArray
Kommunikasjonsmodul:	Shimadzu SCL-10A VP
Programvare:	Class VP, versjon 6.12, sp5 Class VP, versjon 6.14, sp2 (fra 12.01.07)
Pumpe:	Shimadzu LC-10AS Shimadzu LC-20AT (fra 12.01.07)

BETINGELSER

Kolonne:	Discovery® HS C18, 25 cm * 4,6 mm, 5 µm, Col. 78256-03, Supelco, Bellefonte, USA
Mobilfase:	Acetonitril:Metanol:0,005 M fosfatbuffer med 0,00625 M heptansulfonsyre, 10:15:75 (v/v/v)
Injektorvæske:	Metanol:Milli-Q-vann; 20:80 (v/v)
Skyllevæske pumpe:	Metanol:Milli-Q-vann; 10:90 (v/v)
Mobilfasehastighet:	1,2 ml/min
Deteksjonsbølgelengde:	273 nm
Injeksjonsvolum:	20 µl
Ekstra injeksjon mellom hver prøve:	Etter hver 3. injeksjon injiseres 50 µl ren metanol
Temperatur:	Romtemperatur (kolonne), 4 °C (prøver)

Analysetid: 15 minutter
Retensjonstid: ca. 11,4 minutter

g) **Kjøleskap**

APPARATUR

Bosch Cooler, Robert Bosch Hausgeräte GMBH, Stuttgart, Tyskland

BETINGELSER:

Temperatur: 5 ± 3 °C
Temperaturdokumentasjon: Malvern overvåkningssystem, TE051K1

h) **Klimaskap**

APPARATUR:

Termaks klimaskap, Solheimsviken, Norge

BETNINGELSER:

Cabinet type: KBP 6395
Temperatur: Se de ulike metodene
Relativ fuktighet: Se de ulike metodene
Temperaturdokumentasjon: Malvern overvåkningssystem, TE075-KLIMA
Fuktighetsdokumentasjon: Malvern overvåkningssystem, HE075-KLIMA

i) **Magnetrører**

Rct BASIC, IKA Labortechnik, Tamro lab AS, Oslo, Norge
IKA®RET basic C Labortechnik, Tamro lab AS, Oslo, Norge

j) **Magnetrører, stor**

MIDI Mr 1, digital, IKA-werke, Staufen, Tyskland

k) **Milli-RO / Milli-Q-vannrensesystem**

Milli-RO 8 plus og Milli-Q plus, Millipore S.A., Molsheim, Frankrike

l) **Oksygenelektrode**

APPARATUR:

Dissolved Oxygen Analyzer, Model 3100, Insite Instrumentation Group, Inc,
Slidell, Louisiana

BETINGELSER:

Temperatur: romtemperatur
Salinitet: 0,9 % (w/v) natriumklorid

m) pH-meter

pH-meter 691, Metrohm Ltd., Herisau, Sveits

n) Pipetter

Diverse Finnpipetter 5 µl-10 ml, Thermo labsystems, Helsinki, Finland

o) Spektrofotometer

Spektrofotometer mini UV1240, Shimadzu, Duisburg, Tyskland

p) Sprøyter

BD Plastipak, BD, New Jersey, USA

Sprøyte og stempel: polypropylen

Pakning: syntetisk isoprem, latexfri, overflatebehandlet („ytbehandlet“) med silikon. Hverken sprøyte, stempel eller pakning inneholder ftalater.

Codan, Codan Medical ApS, Rødby, Danmark

Sprøyte og stempel: polypropylen

Pakning: en ring av medisinsk silikon

Terumo, Terumo Europe N. V., Leuven, Belgia

Sprøyte og stempel: polypropylen

Pakning: termoplastisk elastomer, latexfri

Smøremiddel: silikonolje

Propp til sprøyte, BD Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Sverige

q) **Suntest CPS stimulator (1,8 kW Xe-lampe) – til bestråling av preparatet**

Heraeus GmbH, Hanau, Tyskland, utstyrt med IR-reflekterende kvartsglass og et glassfilter med transmisjon 310-800 nm. Intensitet: 765 W/m^2

r) **Ultralydbad**

Branson 5510, Branson Ultrasonics b.v., Soest, Nederland

s) **Whirlimixer™**

Fisons Scientific Apparatus, Leicestershire, England

2.3 LØSNINGER

Tabell 4: HPLC-løsninger

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fosfatbuffer 0,005 M	Kaliumdihydrogenfosfat	0,68 g
	Natrium-1-heptansulfonat	1,26 g
	Milli-Q-vann	Ad 1000 ml
Mobilfase	Acetonitril	10 deler
	Metanol	15 deler
	Fosfatbuffer 0,005 M	75 deler
Injektorvæske	Metanol	20 deler
	Milli-Q-vann	80 deler

Tabell 5: Løsninger til standardkurve ved forsøk der annet ikke er spesifisert (HPLC)

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid	10 mg
	Natriummetabisulfitt	50 mg
	Natriumklorid	0,86 g
	Milli-Q-vann	Ad 10 ml
Fenylefrin 50 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	50 µl
	Milli-Q-vann	950 µl
Fenylefrin 100 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	100 µl
	Milli-Q-vann	900 µl
Fenylefrin 150 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	150 µl
	Milli-Q-vann	850 µl

2.3.1 Validering av HPLC-analysemetode

Tabell 6: Linearitet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid	10 mg
	Natriummetabisulfitt	50 mg
	Natriumklorid	0,86 g
	Milli-Q-vann	Ad 10 ml
Fenylefrin 40 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	40 µl
	Milli-Q-vann	960 µl
Fenylefrin 50 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	50 µl
	Milli-Q-vann	950 µl
Fenylefrin 80 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	80 µl
	Milli-Q-vann	920 µl
Fenylefrin 100 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	100 µl
	Milli-Q-vann	900 µl
Fenylefrin 120 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	120 µl
	Milli-Q-vann	880 µl
Fenylefrin 150 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml	150 µl
	Milli-Q-vann	850 µl

Tabell 7: Nøyaktighet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 50 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	50 mg 0,25 g 4,3 g Ad 1000 ml
Fenylefrin 100 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	100 mg 0,5 g 8,6 g Ad 1000 ml
Fenylefrin 150 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	150 mg 0,75 g 12,9 g Ad 1000 ml

Tabell 8: Intradagvariasjon

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	10 mg 50 mg 0,86 g Ad 10 ml
Fenylefrin 100 µg/ml	Fenylefrin 1 mg/ml Milli-Q-vann	5 ml Ad 50 ml

Tabell 9: Systempresisjon og interdagvariasjon

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 0,1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	100 mg 0,5 g 8,6 g Ad 1000 ml

Tabell 10: Spesifisitet og robusthet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
AAPH 48 mg/ml	AAPH Milli-Q-vann	239,9 mg Ad 5 ml
Oksidasjon av preparat: fenylefrin 96,9 µg/ml, AAPH 1,49 mg/ml	AAPH 48 mg/ml <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske,</i> batch 601116	0,5 ml 3 ampuller (15,6 ml)
Oksidert prøve til analyse:	Prøve satt til degradering; fenylefrin 96,9 µg/ml, AAPH 1,49 mg/ml Milli-Q-vann	1 del 1 del
Prøve for basedegradering av preparat: pH 8,9, fenylefrin 97,5 µg/ml	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske,</i> batch 601116 Natriumhydroksid 0,5 M	3 ampuller (15,6 ml) Ad pH 8-8,5
Basedegradert prøve til analyse	Basisk prøve satt til degradering; pH 8,9, fenylefrin 97,5 µg/ml Milli-Q-vann	1 del 1 del

Tabell 11: Robusthet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Buffer, pH 5,3 (pH-økning: 0,5 enheter)	Kaliumdihydrogenfosfat Natrium-1-heptansulfonat Kaliumhydroksid, 5 M Milli-Q-vann	0,34 g 0,63 g Ad pH 5,3 Ad 500 ml
Mobilfase (pH økt med kaliumhydroksid 5 M)	Acetonitril Metanol Buffer, pH 5,3	10 deler 15 deler 75 deler
Buffer, pH 4,3 (pH-nedgang: 0,5 enheter)	Kaliumdihydrogenfosfat Natrium-1-heptansulfonat Fosforsyre, 1 M Milli-Q-vann	0,34 g 0,63 g Ad pH 4,3 Ad 500 ml
Mobilfase (pH senket med 1,0 M fosforsyre)	Acetonitril Metanol Buffer, pH 4,3	10 deler 15 deler 75 deler
Mobilfase (høyere andel organisk fase; 31 %)	Acetonitril Metanol Buffer	13 deler 18 deler 69 deler
Mobilfase (lavere andel organisk fase; 19 %)	Acetonitril Metanol Buffer	7 deler 12 deler 81 deler
Mobilfase (lavere andel organisk fase; 23 %)	Acetonitril Metanol Buffer	9 deler 14 deler 77 deler

Tabell 12: Prøvestabilitet

Løsning	Innhold	Mengde
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml</i> <i>injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml</i> <i>injeksjonsvæske, batch 703706</i>	1 ampulle

2.3.2 Preformulering

Tabell 13: Kjemisk degradering av fenylefrin

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1</i> : fenylefrin 2 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	30 mg Ad 15 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø	H ₂ O ₂ 30 % Stamløsning 1 Milli-Q-vann	2 ml 1 ml Ad 20 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml i basisk miljø, pH 10	Stamløsning 1 Natriumhydroksid, 0,5 M Milli-Q-vann	1,25 ml Ad pH 10 Ad 25 ml
<i>Stamløsning 2</i> : Fe(II) 1 mg/ml	FeSO ₄ *7H ₂ O Milli-Q-vann	24,9 mg Ad 5 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(II)	Stamløsning 2 Stamløsning 1 Milli-Q-vann	1,25 ml 1,25 ml Ad 25 ml
<i>Stamløsning 3</i> : Fe(III) 1 mg/ml	FeCl ₃ Milli-Q-vann	14,5 mg Ad 5 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(III)	Stamløsning 3 Stamløsning 1 Milli-Q-vann	1 ml 1 ml Ad 20 ml
<i>Stamløsning 4</i> : Cu (II) 1 mg/ml	CuSO ₄ Milli-Q-vann	12,6 mg Ad 5 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Cu(II)	Stamløsning 4 Stamløsning 1 Milli-Q-vann	1 ml 1 ml Ad 20 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø (2)	AAPH Stamløsning 1 Milli-Q-vann	29,8 mg 1 ml Ad 20 ml
Standard 1: fenylefrin 50 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	12,5 mg Ad 250 ml
Standard 2: fenylefrin 80 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	20 mg Ad 250 ml
Standard 3: fenylefrin 100 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	10 mg Ad 100 ml
Standard 4: fenylefrin 120 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	12 mg Ad 100 ml

Tabell 14: Innledende varmedegraderingsforsøk ved 60 °C og 121 °C

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, batch 601116</i>	3 ampuller
Fenylefrin 0,1 mg/ml til 16-minutters autoklaveringscykluser	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Saltsyre 0,1 M Milli-Q-vann	25 mg 2,15 g Ad pH 4,1* Ad 250 ml
<i>Stamløsning</i> : fenylefrin 1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	10 mg Ad 10 ml
Standard 1: fenylefrin 50 µg/ml	Stamløsning Milli-Q-vann	250 µl Ad 5 ml
Standard 2: fenylefrin 80 µg/ml	Stamløsning Milli-Q-vann	400 µl Ad 5 ml
Standard 3: fenylefrin 100 µg/ml	Stamløsning Milli-Q-vann	500 µl Ad 5 ml
Standard 4: fenylefrin 120 µg/ml	Stamløsning Milli-Q-vann	600 µl Ad 5 ml

*(gjennomsnitt av pH målt under produksjon i batch nummer 511765, 611713 og 607704)

Tabell 15: Innledende varmedegraderingsforsøk i autoklav, 121 °C i 5 timer

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	20 mg 0,10 g 1,72 g Ad 200 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	20 mg 1,72 g Ad 200 ml
Kontrolløsning	Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	25 mg 0,43 g Ad 50 ml

2.3.3 Formulering, produksjonsprosess og stresstesting

Tabell 16: Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet:

Varmebehandling av prøver med fenylefrin 0,05 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-0,5 mg/ml

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1:</i> fenylefrin 25 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Milli-Q-vann	125 mg Ad 5 ml
<i>Stamløsning 2:</i> natriummetabisulfitt 125 mg/ml	Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	1,25 g Ad 10 ml
Natriummetabisulfitt 0 mg/ml	Stamløsning 1 Natriumklorid Milli-Q-vann	0,5 ml 2,15 g Ad 250 ml
Natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Natriumklorid Milli-Q-vann	0,5 ml 0,25 ml 2,15 g Ad 250 ml
Natriummetabisulfitt 0,250 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Natriumklorid Milli-Q-vann	0,5 ml 0,5 ml 2,15 g Ad 250 ml
Natriummetabisulfitt 0,375 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Natriumklorid Milli-Q-vann	0,5 ml 0,75 ml 2,15 g Ad 250 ml
Natriummetabisulfitt 0,500 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Natriumklorid Milli-Q-vann	0,5 ml 1 ml 2,15 g Ad 250 ml

Tabell 17: Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet:

Varmebehandling av prøver med fenylefrin 0,10 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-1,0 mg/ml

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1</i> : fenylefrin 1 mg/ml og natriumklorid 86 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	250 mg 21,5 g Ad 250 ml
<i>Stamløsning 2</i> : natriummetabisulfitt 50 mg/ml	Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	5,0 g Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0 mg/ml	Stamløsning 1 Milli-Q-vann	10 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 0,25 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0,250 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 0,5 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0,375 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 0,75 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0,500 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 1 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 0,750 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 1,5 ml Ad 100 ml
Natriummetabisulfitt 1,000 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 2 ml Ad 100 ml

Tabell 18: Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet:

Varmebehandling av prøver med fenylefrin 0,10 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-10 mg/ml

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1</i> : fenylefrin 1 mg/ml og natriumklorid 86 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	100 mg 8,6 g Ad 100 ml
<i>Stamløsning 2</i> : natriummetabisulfitt 20 mg/ml	Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	1,0 g Ad 50 ml
<i>Stamløsning 3</i> : natriummetabisulfitt 5 mg/ml	Stamløsning 2 Milli-Q-vann	2,5 ml Ad 10 ml
Natriummetabisulfitt 0 mg/ml	Stamløsning 1 Milli-Q-vann	20 ml Ad 200 ml
Natriummetabisulfitt 0,0625 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 0,625 ml Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 1,25 ml Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 0,1875 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 1,875 ml Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 0,25 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 2,5 ml Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	20 ml 5 ml Ad 200 ml
Natriummetabisulfitt 5,0 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	5 ml 12,5 ml Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 10,0 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	5 ml 25 ml Ad 50 ml

Tabell 19: Effekt av ulike stabilisatorer i forskjellige kombinasjoner

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1</i> : fenylefrin 1 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	25 mg 21,5 g Ad 250 ml
<i>Stamløsning 2</i> : natriummetabisulfitt 50 mg/ml	Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	5,0 g Ad 100 ml
<i>Stamløsning 3</i> : askorbinsyre 100 mg/ml	Askorbinsyre Milli-Q-vann	20,0 g Ad 200 ml
<i>Stamløsning 4</i> : dinatriumedetat 10 mg/ml	Dinatriumedetat Milli-Q-vann	0,5 g Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 2 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	10 ml 2 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 20 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 10 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 40 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 20 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 0,1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	10 ml 1 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 0,5 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 2,5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 2 mg/ml og dinatriumedetat 0,1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 1 ml 0,5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 2 mg/ml og dinatriumedetat 1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 1 ml 5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 40 mg/ml og dinatriumedetat 0,1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 1 ml 0,5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 40 mg/ml og dinatriumedetat 1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 3 Stamløsning 4 Milli-Q-vann	5 ml 20 ml 5 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,2 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 1 ml 0,4 ml Ad 100 ml
Tabellen fortsetter på neste side....		

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
...tabellen fortsetter fra forrige side.		
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 10 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 1 ml 20 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 1 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,2 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 10 ml 0,4 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 1 mg/ml og natriummetabisulfitt 10 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 4 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 10 ml 20 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 2 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,2 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 0,2 ml 1 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 40 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,2 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 0,2 ml 20 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 2 mg/ml og natriummetabisulfitt 10 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 10 ml 1 ml Ad 50 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med askorbinsyre 40 mg/ml og natriummetabisulfitt 10 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Stamløsning 3 Milli-Q-vann	5 ml 10 ml 20 ml Ad 50 ml

*Prøver som ikke er stabilisert eller kun er stabilisert med natriummetabisulfitt er oppgitt i Tabell 17, side 43.

Tabell 20: Effekt av nitrogengassing: Varmebehandling av degassede og ikke-degassede prøver med og uten natriummetabisulfitt

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1:</i> fenylefrin 1 mg/ml og natriumklorid 86 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	100 mg 8,6 g Ad 100 ml
<i>Stamløsning 2:</i> natriummetabisulfitt 20 mg/ml	Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	1,0 g Ad 50 ml
Natriummetabisulfitt 0 mg/ml	Stamløsning 1 Milli-Q-vann	20 ml Ad 200 ml
Natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	20 ml 5 ml Ad 200 ml

2.3.4 Degassing av fysiologisk saltvann

Tabell 21: Degassing av fysiologisk saltvann

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
0,9 % (w/v) natriumklorid	Natriumklorid	90 g
	Springvann	10 L
0,9 % (w/v) natriumklorid	Natriumklorid	360 g
	Springvann	40 L

2.3.5 Stabilitetstesting

Tabell 22: Stabilitet på sprøyte:

Stabilitet av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* på BD Plastipaksprøyter

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, batch 703706</i>	10 ampuller
Kontrolløsning (natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml, natriumklorid 8,6 mg/ml)	Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	10 mg 0,172 g Ad 20 ml

Tabell 23: Stabilitet på sprøyte:

Stabilitet av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* på hetteglass og sprøyter fra tre forskjellige fabrikanter

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, batch 703706</i>	15 ampuller
Kontrolløsning (natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml, natriumklorid 8,6 mg/ml)	Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	0,1 g 1,72 g Ad 200 ml
Kontrolløsning (Milli-Q-vann)	Milli-Q-vann	q.s.

Tabell 24: Stabilitet i lys:

Løsninger med og uten natriummetabisulfitt

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fenylefrin 0,1 mg/ml, løsning med natriummetabisulfitt	Fenylefrinhydroklorid Natriummetabisulfitt Natriumklorid Milli-Q-vann	10 mg 50 mg 0,86 g Ad 100 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml, løsning uten natriummetabisulfitt	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	10 mg 0,86 g Ad 100 ml
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, batch 703706</i>	3 ampuller

Tabell 25: Stabilitet i lys:
Løsninger med ulike mengder 5-HMF

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning: 5-HMF</i> 1,0 mg/ml	5-(hydroksymetyl)-2-furaldehyd Milli-Q-vann	85 mg 8,5 g
Fenylefrin 100 µg/ml og 5-HMF 5 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Stamløsning 5-HMF Milli-Q-vann	10 mg 0,5 ml Ad 100 ml
Fenylefrin 100 µg/ml og 5-HMF 22,6 µg/ml	Fenylefrinhydroklorid Stamløsning 5-HMF Milli-Q-vann	10 mg 2,258 ml Ad 100 ml

Tabell 26: Pilotbatch

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Stamløsning 1:</i> fenylefrin 2,5 mg/ml og natriumklorid 215 mg/ml	Fenylefrinhydroklorid Natriumklorid Milli-Q-vann	250 mg 21,5 g Ad 100 ml
<i>Stamløsning 2:</i> dinatriumedetat 25 mg/ml	Dinatriumedetat Milli-Q-vann	0,5 g Ad 20 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml uten stabilisator	Stamløsning 1 Milli-Q-vann	10 ml Ad 250 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml	Stamløsning 1 Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	10 ml 31,3 mg Ad 250 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml	Stamløsning 1 Natriummetabisulfitt Milli-Q-vann	10 ml 0,125g Ad 250 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 0,1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 1 ml Ad 250 ml
Fenylefrin 0,1 mg/ml med dinatriumedetat 1 mg/ml	Stamløsning 1 Stamløsning 2 Milli-Q-vann	10 ml 10 ml Ad 250 ml

Tabell 27: Langtidsstabilitetsstudie av Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>	<i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, batch 703706</i>	50 ampuller

3. METODER

I forsøk der annet ikke er spesifisert, ble det til HPLC-analysene benyttet en mobilfase bestående av 25 % (v/v) organisk fase (10 % acetonitril og 15 % metanol) og 75 % 0,005 M fosfatbuffer med 0,00625 M heptansulfonsyre; en injektorløsning med 20 % (v/v) metanol (Tabell 4, side 37) og en vaskeløsning med 70 % (v/v) metanol. Bufferen ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Mobilfasen ble så målt ut med målekolber. Mobilfase, injektorvæske og vaskeløsning ble blandet på magnetrører og degasset på ultralydbad i 30 minutter.

Om ikke annet er spesifisert i løsningsoversikten, ble det laget trepunkts standardkurve av fenylefrinhydroklorid i konsentrasjonene 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml og 0,15 mg/ml (n=3). Standardene ble laget ved utpipettering av stamløsning og Milli-Q-vann direkte i HPLC-injektorglass (Tabell 5, side 37).

3.1 VALIDERING AV ANALYSEMETODE

3.1.1 Linearitet

Metodens lineære respons ble undersøkt ved å analysere 6 løsninger av fenylefrin i et område på 40 til 150 % av konsentrasjonen i dagens preparat. Konsentrasjonene ble fordelt som følger: 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,12 mg/ml og 0,15 mg/ml (n=1).

Fenylefrinhydroklorid (1 mg/ml), natriummetabisulfitt og natriumklorid ble løst i vann (Tabell 6, side 37). Prøvene til linearitetsvalideringen ble laget ved å fortynne denne stamløsningen. Topparealet ble benyttet til å bestemme konsentrasjonen. LC-10 programvare ble benyttet til å bestemme beste regresjonslinje ved minste kvadrats metode.

3.1.2 Nøyaktighet

Metodens nøyaktighet ble undersøkt ved 3 konsentrasjoner av fenylefrin; 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml og 0,15 mg/ml (n=3). Fenylefrinhydroklorid, natriummetabisulfitt og natriumklorid ble løst i 1 liter vann til de respektive konsentrasjoner (Tabell 7, side 38). Et prøvevolum på 1 liter ble benyttet for å gjøre betydningen av veie- og

målekolbefeil så liten som mulig. Målt konsentrasjon ble sammenlignet med teoretisk konsentrasjon.

3.1.3 Intradagvariasjon

Metodens intradagvariasjon ble undersøkt ved å fordele en prøveløsning av fenylefrinhydroklorid (0,1 mg/ml), natriummetabisulfitt, natriumklorid og vann i 6 HPLC-injektorglass (Tabell 8, side 38). Løsningene ble så analysert fortløpende på HPLC. Relativt standardavvik ble beregnet.

3.1.4 Systempresisjon

Systempresisjon ble undersøkt ved å konsentrasjonsbestemme én prøve med fenylefrinhydroklorid (0,1 mg/ml), natriummetabisulfitt og natriumklorid (Tabell 9, side 38). Prøve ble injisert fortløpende 6 ganger fra samme prøveglass. Relativt standardavvik ble beregnet.

3.1.5 Interdagvariasjon

Metodens interdagvariasjon ble undersøkt ved å lage en løsning med fenylefrinhydroklorid (0,1 mg/ml), natriummetabisulfitt og natriumklorid (Tabell 9, side 38). Løsningen ble fordelt i 3 prøveglass og 15 hetteglass. Prøvene i prøveglassene ble analysert samme dag. Hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og frosset ned for analyse på fem tilfeldig valgte dager over et tidsrom på 41 dager. Relativt standardavvik mellom resultatene fra alle analysedagene ble beregnet.

3.1.6 Spesifisitet

Prøver av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ble degradert ved 1) økning av pH til 8,9 og 2) tilsetning av oksidasjonsfremmende 2,2'-Azobis(2-metylpropionamidin) dihydroklorid (AAPH) (Betigeri et al., 2005) (Tabell 10, side 39). Etter oppbevaring i 43 dager ved 60 °C og 40 % relativ luftfuktighet, ble prøvene fortynnet til halv konsentrasjon og analysert på HPLC. Kromatogrammene ble undersøkt for å se hvorvidt metoden separerte virkestoff og degraderingsprodukter.

3.1.7 Robusthet

Prøver av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ble degradert ved 1) økning av pH til 8,9 og 2) tilsetning av AAPH (Tabell 10, side 39). Etter oppbevaring i 49 dager ved 40 °C, ble prøvene fortynnet til halv konsentrasjon og analysert på HPLC. Metodens robusthet ble undersøkt ved å se om mindre endringer i mobilfasens hastighet ($\pm 0,2$ ml/min), pH ($\pm 0,5$) samt andel organisk fase (± 6 % (v/v) og -2 % (v/v)) påvirket separasjonen av virkestoff og degraderingsprodukter (Tabell 11, side 39).

3.1.8 Prøvestabilitet

Prøver av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* (Tabell 12, side 39) ble overført til 6 HPLC-injektorglass som ble analysert ved tid 0, 24 timer og 72 timer. Mellom analysetidspunktene ble alle septum byttet og prøvene ble oppbevart i kjøleskap. Nye standarder ble laget før hvert analysetidspunkt. Prosentvis endring ble beregnet.

3.2 PREFORMULERING

3.2.1 Kjemisk degradering

Løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml ble forsøkt degradert ved metoder som tidligere er oppgitt å gi degradering av fenylefrin ved hjelp av hydrogenperoksid (H_2O_2), natriumhydroksid, toverdig jern (Fe(II)), treverdig jern (Fe(III)) og toverdig kobber (Cu(II)) (Tabell 13, side 40). AAPH er tilsatt i en prøve da det er kjent at fenylefrin oksideres. Alle løsninger ble laget som duplikater i målekolber, før 20 ml fra hver av målekolbene ble overført til to 20 ml hetteglass, proppet med klorbutylpropp og kapslet. Hetteglassene ble så fordelt slik at alle løsninger ble oppbevart ved 60 °C og 90 °C i opptil 48 timer. To prøver ble også analysert etter 48 timer ved romtemperatur. Prøvene ble ikke gasset med nitrogengass.

Uttak av prøver ble gjort etter 24 timer og analysert kvantitativt på HPLC. Prøvene ble filtrert i de tilfellene der hetteglassene inneholdt utfelling (se Filter for filtrering av væske, 5 μm , side 32). Prøver det var interessant å se videre på, ble også analysert etter 48 timers oppbevaring. Rester fra prøver som ble tilsatt natriumhydroksid og prøver som ble tilsatt toverdig jern ble også oppbevart i sine respektive målekolber ved romtemperatur og analysert etter 48 timer.

3.2.2 Varmedegradering: innledende forsøk

Forsøk 1: 60 °C og 40 % RH, 105 dager

Tre ampuller av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ble oppbevart ved 60 °C og 40 % relativ luftfuktighet i 105 dager (Tabell 14, side 41).

Forsøk 2: Varmebehandling ved autoklaveringscykluser

Fenylefrinhydroklorid (0,1 mg/ml) og natriumklorid ble løst i vann. pH ble justert til 4,1 med saltsyre (Tabell 14, side 41). pH 4,1 tilsvarer gjennomsnittlig pH målt under produksjon (før autoklaving) i tre batcher av preparatet. Natriummetabisulfitt ble ikke tilsatt da effekt av dette stoffet på holdbarheten av fenylefrin skal undersøkes separat.

24 hetteglass ble fylt med 10 ml løsning før de ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke gasset med nitrogengass. Hetteglassene ble satt til autoklaving ved standard autoklaveringscyklus; 121 °C i 16 minutter. Det ble utført et antall autoklaveringscykluser som ga tilstrekkelig degradering av fenylefrin; 16 sykluser ble derfor kjørt over et tidsrom på to dager; dag 1 (n=11) og dag 2 (n=5). Mellom dag 1 og dag 2 ble hetteglassene oppbevart i kjøleskap. Etter hver syklus ble ett hetteglass analysert kvantitativt (HPLC) for å bestemme gjenværende mengde fenylefrin.

Forsøk 3: 121 °C i 5 timer

Effekten av en lengre varmebehandling ble undersøkt ved å lage to løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml (n=6). Den ene løsningen inneholdt i tillegg natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml (n=6). Det ble dessuten laget en kontrolløsning med natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml (n=1) (Tabell 15, side 41). 20 ml løsning ble pipettert ut i 20 ml hetteglass før de ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke gasset med nitrogengass. Hetteglassene ble satt i autoklav til varmebehandling ved 121 °C i 5 timer.

3.3 FORMULERING, PRODUKSJONSPROSESS OG STRESSTESTING

3.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet

Forsøk 1: Fenylefrin 0,05 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-0,5 mg/ml

Effekten av natriummetabisulfitt på fenylefrin ble undersøkt ved å lage fem løsninger av med fenylefrinhydroklorid 0,05 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml som inneholdt natriummetabisulfitt i konsentrasjoner på henholdsvis 0,5 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml og 0 mg/ml (n=6) (Tabell 16, side 42). Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke degasset. Samtlige hetteglass ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C før de ble analysert på HPLC. Varmebehandlingen ble utført over to dager. Mellom varmebehandlingssyklusene ble prøvene oppbevart i kjøleskap.

Forsøk 2: Fenylefrin 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-1,0 mg/ml

Effekten av natriummetabisulfitt ble videre undersøkt ved å lage syv løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml med natriumklorid 8,6 mg/ml som inneholdt natriummetabisulfitt i konsentrasjoner på henholdsvis 1,0 mg/ml (n=3), 0,75 mg/ml (n=3), 0,5 mg/ml (n=6), 0,375 mg/ml (n=3), 0,25 mg/ml (n=6), 0,125 mg/ml (n=3) og 0 mg/ml (n=6) (Tabell 17, side 43). Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke degasset. Samtlige hetteglass ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C før de ble analysert på HPLC. Varmebehandlingen ble utført over to dager. Mellom varmebehandlingssyklusene ble prøvene oppbevart i kjøleskap.

Forsøk 3: Fenylefrin 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 0-10 mg/ml

Effekten av natriummetabisulfitt ble til sist undersøkt over et større konsentrasjonsområde ved å lage åtte løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml med natriumklorid 8,6 mg/ml som inneholdt natriummetabisulfitt i konsentrasjoner på

henholdsvis 10,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,1875 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml og 0 mg/ml (n=3) (Tabell 18, side 44). Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke degasset. Samtlige hetteglass ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C før de ble analysert på HPLC. Varmebehandlingen ble utført over to dager. Mellom varmebehandlingssyklusene ble prøvene oppbevart i kjøleskap.

3.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet

Effekten av tre ulike stabilisatorer på termisk stabilitet av fenylefrin ble undersøkt ved å analysere 18 løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,10 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml sammen med en eller flere stabilisatorer (Tabell 28).

Tabell 28: Innhold av ulike stabilisatorer (n=3) (Tabell 19, side 45)

Konsentrasjon (mg/ml)*			
<i>Kombinasjon</i>	<i>Dinatrium- edetat</i>	<i>Natrium- metabisulfitt</i>	<i>Askorbinsyre</i>
1			2
2			20
3			40
4	0,1		
5	0,5		
6	1		
7	0,1		2
8	1		2
9	0,1		40
10	1		40
11	0,1	0,2	
12	0,1	10	
13	1	0,2	
14	1	10	
15		0,2	2
16		0,2	40
17		10	2
18		10	40

*Prøver som kun er stabilisert med natriummetabisulfitt og prøven som ikke er stabilisert er hentet fra Tabell 17, side 43.

Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Prøvene ble ikke degasset. Samtlige hetteglass ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C før de ble analysert på

HPLC. Varmebehandlingen ble utført over to dager. Mellom varmebehandlingssyklusene ble prøvene oppbevart i kjøleskap.

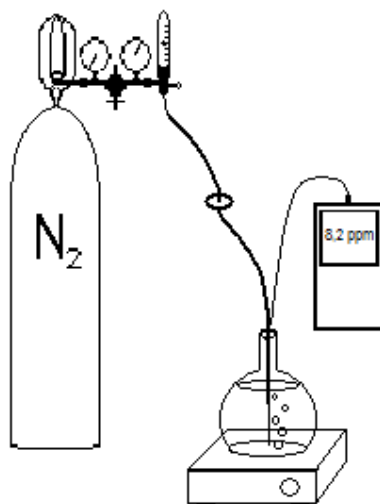
3.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet

Effekten av nitrogengassing på stabilitet av fenylefrin (0,10 mg/ml) utsatt for varme ble undersøkt både i løsninger med og i løsninger uten natriummetabisulfitt (Tabell 20, side 46). I tillegg til fenylefrin inneholdt løsningene enten bare natriumklorid 8,6 mg/ml (n=12), eller både natriumklorid 8,6 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml (n=12). Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Løsningene ble delt i to; løsninger med natriummetabisulfitt (n=6) og uten natriummetabisulfitt (n=6) som *ikke* skulle degasses og løsninger med natriummetabisulfitt (n=6) og uten natriummetabisulfitt (n=6) som *skulle* degasses. Prøver som skulle degasses ble gasset med nitrogen i 20 sekunder. Gasshastigheten ble justert til en hastighet som var høyest mulig, men uten at løsningene sprutet ut av hetteglassene. En pasteurpipette ble benyttet for å lede gassen ned i løsningene. Hetteglassene ble proppet og kapslet umiddelbart etter degassing. Samtlige hetteglass ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C før de ble analysert kvantitativt på HPLC. Varmebehandlingen ble utført over to dager. Mellom varmebehandlingssyklusene ble prøvene oppbevart i kjøleskap.

3.4 DEGASSING AV FYSIOLOGISK SALT VANN

Det er aktuelt å gasse fenylefrinpreparatet med nitrogen for å drive ut oksygen. For å oppnå reproducerbare betingelser ved degassing av større volumer ble følgende forsøk gjort: natriumklorid ble løst i springvann til en konsentrasjon på 0,9 % (w/v) i henholdsvis 10 L (dag 1) og 40 L (dag 2) (Tabell 21, side 47). Overflødig væske ble fjernet etter hvert som mindre volumer ble degasset. Vannet hadde en temperatur tilsvarende romtemperaturen. Et manometer og en gasshastighetsmåler ble koblet til en gasstank med nitrogen (Figur 12, side 56). Fra manometeret gikk det en plastslange til et luftfilter (se Filter for filtrering av luft, 0,2 µm, side 32). En plastslange nummer to gikk så fra filteret til et hult, sylindrisk lodd av rustfritt stål. Loddet sikret at slangen ble liggende i bunnen av beholderen. Alle forsøk ble gjort med magnetrører. I forsøk med 5-10 L væske ble det benyttet en 12 L rundkolbe. I forsøk med 20-40 L væske ble det benyttet en 50 L ståltank der lokket ble plassert løst på for ikke å klemme gasslangen. Laveste og høyeste avlesbare gasshastighet for den anvendte

gasshastighetsmåleren, henholdsvis 1 L/min og 6 L/min, ble forsøkt. Et apparat for måling av oppløst oksygen (se Oksygenelektrode, side 34) ble benyttet for å bestemme mengden gjenværende oksygen i løsningen. Verdiene ble logget hvert minutt. Etter hver degassingssyklus ble løsningen gasset med vanlig luft til løsningen hadde et innhold av oksygen på 6,9-7,7 ppm.



Figur 12: Utstyrsoppsett ved degassing i 12 liters rundkolbe. Ved større volum ble det benyttet en 50 liters ståltank med løstliggende lokk.

3.5 STABILITETSTESTING

3.5.1 Stabilitet på sprøyte

Forsøk 1: BD Plastipak

Stabilitet av *Fenylefrin* 0,1 mg/ml injeksjonsvæske opptrukket på sprøyte ble undersøkt ved å fylle sprøyter av merket BD Plastipak (se Sprøyter, side 35) (n=6) med preparat fra rutineproduksjon ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet (Tabell 22, side 47). I tillegg ble en sprøyte fylt med kontrolløsning av natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml. Sprøytene ble proppet med sprøytepropper og lagt til oppbevaring i klimaskap ved 22,5 °C og 40 % relativ luftfuktighet. Innholdet ble analysert ved tidene 0 timer, 8 timer, 24 timer og 14 dager. Det ble tatt en ekstra analyse etter 103 dager for studere utviklingen.

Forsøk 2: BD Plastipak, Terumo, Codan og hetteglass

Stabilitet av *Fenylefrin* 0,1 mg/ml injeksjonsvæske opptrukket på sprøyte ble undersøkt ved å fylle hetteglass (n=3) og sprøyter av merkene BD Plastipak (n=6) (for sprøytespesifikasjon, se Sprøyter, side 35), Terumo (n=3) og Codan (n=3) med Sykehusapotekets fenylefrinpreparat (Tabell 23, side 47). Som kontrolløsninger ble det benyttet en løsning av natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml i Milli-Q-vann (n=3) eller rent Milli-Q-vann uten ekstra tilsetninger (n=3). Sprøytene ble proppet med sprøytepropper, mens hetteglassene ble proppet med klorbutylpropp og kapslet. Alle prøvene ble oppbevart i klimaskap ved 22,5 °C og 60 % relativ luftfuktighet. En økning i relativ luftfuktighet fra 40 til 60 % fra forsøk 1 til forsøk 2 skulle motvirke mulig fordampning og samsvarer med tidligere forsøk gjort ved Sykehusapoteket, Rikshospitalet (Brænden et al., 2003). Innholdet i sprøytene og hetteglassene ble analysert ved tidene 0 timer, 8 timer, 24 timer, 7 dager og 14 dager.

3.5.2 Stabilitet i lys

ICH har definert kriterier for testing av legemidlers fotostabilitet (International Conference of Harmonization, 1996). Minimumskrav til lystoleranse for UV-eksponering (320-400 nm) er satt til 200 watt timer/m². Tilsvarende minimumskrav for synlig lys (400-800 nm) er 1,2 millioner lux timer. Ved bruk av maksimumsverdien for stråling (765 watt/m²) i det aktuelle kammeret tilsvarer 200 watt timer/m² en eksponering i Suntest CPS på 2,9 timer, mens 1,2 millioner lux timer tilsvarer en eksponeringstid på 7,1 timer (Atlas material testing solutions, 1996). ICH-krav for preparater markedsført etter 1. januar 1998 er at preparatet må holde kriteriet "limits justified by Applicant" (International Conference of Harmonization, 1996; Kristensen, 2004). I praksis vil dette si at hver produsent må vurdere sine resultater ut fra hva de mener er forsvarlig. Interne retningslinjer ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet fastsetter shelf life til 90 %. Shelf life innbefatter imidlertid et samlet resultat fra alle degraderingsprosessene i preparatet – ikke utelukkende degradering som skyldes bestråling. Hvor mye degradering som kan aksepteres etter bestråling avhenger dermed av hvilke andre prosesser som påvirker preparatet og i hvor stor grad de gjør det.

3.5.2.1 Lysstabilitet i prøver med og uten natriummetabisulfitt

Det ble laget løsninger med innhold tilsvarende dagens preparat, samt løsninger der innholdet tilsvarte dagens preparat, men uten innhold av natriummetabisulfitt (Tabell 24, side 47). I hver gruppe ble fem prøver bestrålt, mens én ble brukt som mørkeprøve. Løsningene ble bestrålt i polypropylenrør med skrukork. Prøvene ble ikke degasset. Mørkeprøvene ble pakket inn i aluminiumsfolie og lagt inn i suntest-kammeret sammen med resten av prøvene. Produkt i original primæremballasje (glassampulle) ble også bestrålt (n=3).

Fotostabilitetstesting ble utført i Suntest CPS med full effekt (765 watt/m^2) og kjøling. Det ble benyttet et filter som tilsvarer vindusglass (cut-off ca. 310 nm). Prøvene ble bestrålt i 2,9 timer før første prøveuttak. Deretter ble de bestrålt videre i 4,2 timer; til sammen 7,1 timer.

3.5.2.2 Lysstabilitet i prøver med ulike mengder 5-HMF

Det ble laget løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml med "normal" og høy konsentrasjon 5-hydroksymetyl-2-furaldehyd (5-HMF), henholdsvis 5 og 22,6 µg/ml (Brustugun, 2005) (Tabell 25, side 48). Prøvene ble bestrålt i polypropylenrør med skrukork (n=6), eller behandlet som mørkeprøver (n=3). Prøvene ble ikke degasset. Mørkeprøver ble pakket inn i aluminiumsfolie og lagt i suntest-kammeret sammen med de andre prøvene.

Testing av fotostabilitet i Suntest CPS ble utført med full effekt (765 watt/m^2) og kjøling. Det ble benyttet et filter som tilsvarer vindusglass (cut-off ca. 310 nm). Prøvene ble bestrålt i 2,9 timer før første prøveuttak. De ble så bestrålt videre i 4,2 timer; til sammen 7,1 timer.

3.5.3 Langtidsstabilitet

3.5.3.1 Pilotbatch

Resultater fra akselererte stabilitetsstudier i prosjektet (3.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet, side 53, 3.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet, side 54 og 3.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet, side 55) gjorde det interessant å undersøke stabiliserende effekt av visse konsentrasjoner av natriummetabisulfitt og dinatriumedetat, samt en løsning uten stabilisator, ved

normale oppbevaringsbetingelser. Det ble laget løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml (Tabell 26, side 48). I tillegg til fenylefrin inneholdt løsningene enten bare natriumklorid 8,6 mg/ml (n=24), både natriumklorid 8,6 mg/ml og natriummetabisulfitt, henholdsvis 0,125 mg/ml (n=24) og 0,5 mg/ml (n=24), eller både natriumklorid 8,6 mg/ml og dinatriumedetat, henholdsvis 0,1 mg/ml (n=24) og 1,0 mg/ml (n=24). Ferdige løsninger ble pipettert ut til 10 ml hetteglass. Samtlige løsninger ble gasset med nitrogen i 20 sekunder. Gasshastigheten ble justert til en hastighet som var høyest mulig, men uten at løsningene sprutet ut av hetteglassene. En pasteurpipette ble benyttet for å lede gassen ned i løsningene. Hetteglassene ble proppet og kapslet umiddelbart etter degassing. Prøvene ble autoklavert i en normal autoklaveringscyklus (16 minutter ved 121 °C) før de ble oppbevart i klimaskap ved 25 °C og 60 % relativ luftfuktighet. Prøvene ble analysert kvantitativt på HPLC før og etter autoklaving, samt etter 1 måned, 2 måneder og 3 måneders lagring.

3.5.3.2 Stabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*

Ampuller av preparatet *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* fra rutineproduksjon ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet ble lagt til oppbevaring ved 25 °C og 60 % relativ luftfuktighet (Tabell 27, side 48). Prøver er analysert ved tid 0, etter 3 og etter 6 måneder, og skal analyseres videre ved 9 måneder, 12 måneder, 18 måneder, 24 måneder og 36 måneder (Tabell 29). Studien avsluttes om det er en konsentrasjonsnedgang av fenylefrin på 10 % eller mer. Mengde gjenværende fenylefrin bestemmes i 6 ampuller av preparatet. pH og ledningsevne måles og fysisk utseende kontrolleres; løsningen skal vær blank, uten farge og uten utfellinger. Preparatet er degasset etter ikke-standardisert prosedyre som angitt i hovedforskriften (Vedlegg 1: Hovedforskrift for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* per 15.mars 2007, side 106).

Tabell 29: Prøvetidspunkter for langtidsstabilitetsstudie

Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>		
Oppbevaringstid (måneder)	Stipulert analysedato	Utført
0	23. mars 2007	For resultat, se (4.4.3.2 Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i> , side 99)
3	22. juni 2007	For resultat, se (4.4.3.2 Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i> , side 99)
6	21 sept. 2007	For resultat, se (4.4.3.2 Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i> , side 99)
9	21. des. 2007	
12	23. mars 2008	
18	23. sept. 2008	
24	23. mars 2009	
36	23. mars 2010	

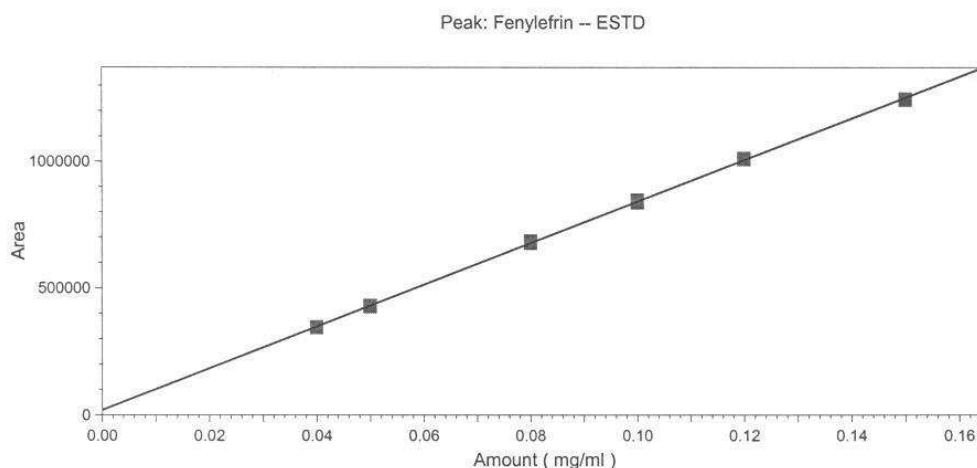
4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.1 VALIDERING AV HPLC-METODEN

4.1.1 Linearitet

Linearitet er evnen metoden har til å gi en respons som er direkte proporsjonal med konsentrasjonen. Linearitet gjelder innenfor et gitt konsentrasjonsområde. ICHs retningslinjer anbefaler at linearitet for en metode måles for minimum 80-120 % av normalkonsentrasjonen om et ferdig produkt skal analyseres. Minst fem konsentrasjoner bør benyttes (International Conference of Harmonization, 2005). Fordi nedbryting av prøver skal undersøkes, velges 40 % av normalkonsentrasjonen som laveste konsentrasjon. Høyeste konsentrasjon settes til 150 % av normal mengde grunnet bruk av standardkurve fra 50-150 % (Clarke, 1994). Analysen utføres på 6 konsentrasjoner.

Korrelasjonskoeffisienten (r) bør være $> 0,999$, med tilsvarende $r^2 > 0,998$. Relativt standardavvik (RSD) bør være $\leq 2,0$ % for hvert punkt (Shabir, 2003). Sykehusapotekene ANS har internkrav på $r^2 \geq 0,998$ og $RSD < 1$ % (Brustugun, 2006). Kravene er oppfylt siden $r^2 \gg 0,999$ (Figur 13). Metoden har tilfredsstillende linearitet i området 0,04–0,15 mg/ml.



Figur 13: Regresjonslinje for fenylefrinhydroklorid i området 0,04 mg/ml-0,15 mg/ml (n=1): $r^2 \gg 0,999$, høyeste RSD=0,5

4.1.2 Nøyaktighet

Nøyaktighet undersøkes ved å sammenligne analysesvaret med ”sann verdi”. ”Sann verdi” kan oppnås gjennom analyse ved en annen og validert metode eller analyse av en løsning med kjent konsentrasjon laget fra en referansestandard. Den teoretiske konsentrasjonen av en løsning laget ved hjelp av færrest mulig veie- og fortynningstrinn vil her anses å være beste tilnærming til ”sann verdi”.

Største avvik (-1,6 %) ble målt ved den laveste av de tre undersøkte konsentrasjonene (0,05 mg/ml) (Tabell 30). Nøyaktigheten bør ligge innenfor ± 2 % (Shabir, 2003). Kravet er oppfylt. Metoden tilfredsstiller kravet til nøyaktighet i området 0,05–0,15 mg/ml.

Tabell 30: Validering av metodens nøyaktighet (n=3)

Teoretisk konsentrasjon (µg/ml)	Analyseresultat (µg/ml)	Avvik (%)
50,0	49,2	-1,6
100,0	100,3	0,3
150,0	150,6	0,4

4.1.3 Intradagvariasjon

Intradaganalysen sier noe om metodens repeterbarhet i løpet av en dag, og foregår under identiske betingelser over en kort tidsperiode. Spredningen av analysesvarene skyldes tilfeldige variasjoner som kan oppstå under en analyse.

Metoden har et relativt standardavvik på 0,3 % på analyser utført i løpet av en dag (Tabell 31). Den bør ha $RSD \leq 2$ % (Shabir, 2003), og dette er oppfylt her. Metoden har tilfredsstillende intradagvariasjon.

Tabell 31: Validering av metodens intradagvariasjon

HPLC-injektorglass :	Konsentrasjon (µg/ml):
1	101,8
2	101,1
3	102,0
4	101,4
5	101,5
6	101,8
Gjennomsnitt:	101,6
SD:	0,3
RSD (%):	0,3

4.1.4 Systempresisjon

Systempresisjonen sier noe om instrumentets repeterbarhet i løpet av kort tid, og foregår under identiske betingelser. Det foretas 6 injeksjoner fra ett HPLC-injektorglass (Chandran and Singh, 2007). Spredningen av analysesvarene skyldes tilfeldige variasjoner som ligger i instrumentet.

Relativt standardavvik for de 6 injeksjonene ble 0,3 % (Tabell 32). RSD bør være ≤ 1 % (Shabir, 2003). Metoden har tilfredsstillende systempresisjon.

Tabell 32: Validering av systemets presisjon

	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)
Injeksjon 1:	99,3
Injeksjon 2:	99,7
Injeksjon 3:	99,7
Injeksjon 4:	100,0
Injeksjon 5:	99,9
Injeksjon 6:	99,9
Gjennomsnitt:	99,7
SD:	0,3
RSD (%):	0,3

4.1.5 Interdagvariasjon

Interdaganalysen sier noe om metodens repeterbarhet i løpet av en lengre periode, og foregår under betingelser som kan variere noe over tid. Spredningen av analysesvarene skyldes tilfeldige forandringer som kan oppstå i et analyselaboratorie. ICH har ikke spesifisert et krav i sine anbefalinger. Et relativt standardavvik på 0,7 % (Tabell 33) oppfyller imidlertid kravet for intradaganalysen, og viser at metoden har god repeterbarhet.

Tabell 33: Validering av metodens interdagsvariasjon

	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)					
	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Dag 6
	100,3	101,4	100,0	100,4	100,8	102,3
		101,3	99,8	100,4	100,8	101,3
		100,7	99,7	100,1	101,0	101,8
Gjennomsnitt:	100,3	101,1	99,8	100,3	100,9	101,8
SD:		0,4	0,1	0,1	0,1	0,5
RSD (%):		0,4	0,1	0,1	0,1	0,5
Gjennomsnitt:	100,7					
SD:	0,7					
RSD (%):	0,7					

4.1.6 Spesifisitet

Spesifisiteten angir metodens evne til å bestemme analytten nøyaktig i nærvær av andre substanser som kan være tilstede i prøvens matriks. Eventuelle degraderingsprodukter og tilsetningsstoffer bør være grunnlinjeseparert fra fenylefrin med en oppløsning, R , $\geq 1,5$ (Greibrokk et al., 1998). Internkrav ved Sykehusapotekene ANS tilsier at R bør være $\geq 1,5$, men må være $\geq 1,0$ (Brustugun, 2006).

I den oksiderte prøven var fenylefrin fullstendig degradert. Den basedegraderte prøven hadde en gjennomsnittlig fenylefrinkonsentrasjon på 0,03 mg/ml. Degraderingen hadde dermed gått lengre enn ønsket for begge prøvene og kan ha gitt sekundære degraderingsprodukter. R -verdier som er oppnådd for den basedegraderte prøven tilfredsstiller minimumskrav internt i Sykehusapotekene ANS da $R \geq 1,2$ (Tabell 34). I den oksiderte prøven var det tilsynelatende ingen stoffer som eluerte i området der fenylefrin var forventet å eluere. Data fra validering av robusthet tyder også på at prøven har tilfredsstillende spesifisitet (Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet, side 110).

Tabell 34: Metodens spesifisitet (n=1)

	Injeksjon nr.:	Oppløsning (R) i forhold til nærmeste topp som eluerer tidligere enn fenylefrin:	Oppløsning (R) i forhold til nærmeste topp som eluerer senere enn fenylefrin:
Basedegradert prøve:	1	6,3	1,2
	2	6,3	1,7
	3	6,3	1,4

4.1.7 Robusthet

Robustheten viser metodens evne til ikke å påvirkes betydelig av mindre endringer i metodens eksperimentelle variabler. Retensjonstiden skal ikke endres så mye at fenylefrintoppen interfererer med andre topper. Oppløsningen bør være $\geq 1,5$, men må være $\geq 1,0$. Prøver av fenylefrin degradert med AAPH inneholdt svært lite virkestoff, mens basedegraderte prøver var nedbrutt til ca. 60 % gjenværende fenylefrin. Degradering utover 20-25 % gir økt sannsynlighet for dannelsen av sekundære degraderingsprodukter. Begge prøvene kan derfor ha inneholdt denne typen degraderingsprodukter.

Retensjonstiden til fenylefrin ligger vanligvis på 11,4 minutter ved mobilfasehastighet 1,2 ml/min. Økt mobilfasehastighet (1,4 ml/min) ga en gjennomsnittlig retensjonstid på 9,8 minutter, mens senket mobilfasehastighet (1,0 ml/min) ga en gjennomsnittlig retensjonstid på 13,6 minutter. En forandring i mobilfasehastighet på $\pm 0,2$ ml/min ser dermed ut til å flytte toppen ca. ± 2 minutter. Ingen av de degraderte prøvene inneholdt topper som interfererte med fenylefrintoppen. Oppløsningen, R , var $\geq 1,2$ i samtlige prøver (Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet, side 110), og tilfredsstillende dermed minimumskravet $R \geq 1,0$.

Både økt og senket pH i mobilfasen ga en gjennomsnittlig retensjonstid på 11,4 minutter. Toppene er oppløst med $R \geq 1,4$ der mulige interferenser ligger nær fenylefrintoppen (Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet, side 110). Måling av pH i mobilfasen under tillaging anses derfor som unødvendig.

Andel organisk modifikator (metanol og acetonitril) i mobilfasen utgjør vanligvis 25 %. Ved en økning til 31 % organisk fase er gjennomsnittlig retensjonstid for fenylefrin forkortet med ca. 4,8 minutter til 6,6 minutter. Det ser likevel ikke ut til at degraderingsproduktene interfererer med fenylefrin. Oppløsningen er $\geq 2,3$ i forhold til de andre toppene i de degraderte prøvene (Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet, side 110).

Ved en reduksjon i andel organisk modifikator til 19 % er retensjonstiden til den første prøven med fenylefrin forlenget med ca. 10,9 minutter, til ca. 22,5 minutter. For å finne ut hvor lite nedgang i organisk fase som skal til for å gi en endring, ble det laget ny mobilfase med 23 % organisk fase. Gjennomsnittlig retensjonstid for fenylefrin ble da 14,2 minutter, altså ble toppen flyttet ca. 2,8 minutter. Forsøket viser viktigheten av nøyaktig utmåling av delmengdene til mobilfasen. Det anbefales at volumer til mobilfasen måles ut med målekolbe, da målekolber har mindre måleusikkerhet enn målesylindere (Tabell 35, side 66). Prøvene er likevel grunnlinjeseparert med $R \geq 1,9$ i begge de degraderte prøvene (Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet, side 110).

Tabell 35: Måleusikkerhet i målesylinder og målekolbe

Målevolum	Måleusikkerhet			
	Målesylinder		Målekolbe	
ml	ml	%	ml	%
1000	±5,0	±0,5	±0,40	±0,04
500	±2,5	±0,5	±0,25	±0,05
250	±1,5	±0,6	±0,15	±0,06
100	±0,5	±0,5	±0,10	±0,10
50	±0,8	±1,6	±0,06	±0,12
25	-	-	±0,80	±0,16

Valideringen viste at metoden påvirkes sterkt av variasjon i mengde organisk fase i mobilfasen, men at små endringer i mobilfasehastighet og mobilfase-pH hadde liten betydning. Mobilfasens ulike komponenter bør måles ut ved bruk av målekolber. Oppløsningen er tilfredsstillende i alle prøver.

4.1.8 Prøvestabilitet

Prøvestabilitet undersøkes for å se om prøvene er tilstrekkelig stabile til at analyser kan strekke seg over noe tid, og at eventuelle forsinkelser ikke medfører tvil om prøvesvarenes riktighet.

Ved analyse av prøvenes stabilitet ble det observert en tilsynelatende konsentrasjonsnedgang på 0,2 % etter 24 timer og 1,3 % etter 72 timer (Tabell 36). Prøvens konsentrasjon skal ikke endre seg mer enn 2 % i løpet av 24 timer ved 4 °C (Shabir, 2003). Kravet er oppfylt også etter 72 timer. HPLC-prøver av produktet er stabile i 72 timer ved 4 °C.

Tabell 36: Stabilitet av prøver oppbevart ved 4 °C i 72 timer

	Konsentrasjon (µg/ml)		
	Tid 0 t	Tid 24 t	Tid 72 t
Prøveglass 1	99,6	98,8	98,5
Prøveglass 2	99,7	99,8	98,4
Prøveglass 3	99,6	99,6	98,2
Prøveglass 4	99,4	99,7	98,2
Prøveglass 5	99,2	98,9	98,2
Prøveglass 6	99,7	99,4	97,9
Gjennomsnitt:	99,5	99,4	98,2
SD:	0,2	0,4	0,2
RSD (%):	0,2	0,4	0,2

4.2 PREFORMULERING

4.2.1 Utvikling av betingelser for stresstesting

Det var behov for å finne en degraderingsmetode som ville gi en reduksjon av fenylefrinkonsentrasjon med ca. 10-15 %. Metoden skulle senere benyttes for å sammenligne effekten av ulike stabilisatorer på stabiliteten av fenylefrin slik formuleringen er i dag og i alternative formuleringer. Det er derfor viktig at metoden har god reproduserbarhet. Termisk degradering ved ulike varmesykluser og tilsetning av substanser som medfører kjemisk degradering av fenylefrin ble studert.

4.2.1.1 Kjemisk degradering

Det er kjent at flere stoffer kan bryte ned fenylefrin, for eksempel hydrogenperoksid (Ossman, 1980; Al Taii et al., 1982; Marin and Barbas, 2004), natriumhydroksid (das Gupta and Mosier, 1972; Gaglia Jr., 1972; Ghanekar and das Gupta, 1978; Ossman, 1980; Schieffer and Hughes, 1983; das Gupta, 2004; Marin and Barbas, 2004), to- og treverdig jern (das Gupta and Mosier, 1972; Millard et al., 1973; Ossman, 1980) og toverdig kobber (Gaglia Jr., 1972) (Tabell 13, side 40). Nedbrytning av fenylefrinløsninger etter tilsetning av disse stoffene ble studert ved økt temperatur (60 og 90 °C) for å se om de ga en formålstjenelig degradering på rimelig tid. Det ble også utført tilsvarende forsøk med et azid (AAPH) da det er kjent at stoffet kan forårsake oksidasjon i løsninger (Betigeri et al., 2005). Prøver som ble forsøkt degradert i basisk miljø og ved tilsetning av toverdig og treverdig jern ble i tillegg undersøkt etter oppbevaring ved romtemperatur i 48 timer.

Etter 24 timer ble det ikke observert degradering i prøver med treverdig jern. Øvrige prøver var degradert til $\leq 81,2 \mu\text{g/ml}$ gjenværende mengde fenylefrin (Tabell 37, side 68). Mange av prøvene ga store relative standardavvik mellom hver prøveinjeksjon i HPLC-systemet, noe som viser en dårlig repeterbarhet av degraderingsmetoden. Dårlig repeterbarhet vil vanskeliggjøre en sammenligning av ulike formuleringer og gjør degraderingsmetoden mindre egnet for bruk i videre formuleringsforsøk. En mulig årsak til dårlig repeterbarhet er at de ulike reagensene kan ha påvirket analysekolonnen. Mange av prøvene viste dessuten missfarging og utfelling og måtte derfor filtreres før analyse (Filter for filtrering av væske, 5 μm , side 32). Filtreringsprosessen kan også ha påvirket repeterbarheten.

Tabell 37: Kjemisk degradering av fenylefrinløsninger ved bruk av forskjellige tilsetninger. Prøvene er oppbevart ved 60 og 90 °C. To prøver er i tillegg oppbevart ved romtemperatur i 48 timer.

Degraderingsmetode (n=1 der annet ikke er spesifisert)	Konsentrasjon etter 24 timer (µg/ml) (RSD)	Konsentrasjon etter 48 timer (µg/ml) (RSD)
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø, H ₂ O ₂ , 60 °C	44,9 (0,6)	-
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø, H ₂ O ₂ , 90 °C	2,4 (11,1)	-
Fenylefrin 0,1 mg/ml i basisk miljø, pH 10, romtemperatur (n=2)	-	57,6 (17,0)/ 64,4 (2,3)
Fenylefrin 0,1 mg/ml i basisk miljø, pH 10, 60 °C	68,2 (2,6)	54,2 (16,4)
Fenylefrin 0,1 mg/ml i basisk miljø, pH 10, 90 °C	39,1 (17,2)	38,3 (5,6)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(II), romtemperatur (n=2)	-	101,1 (1,3)/ 112,0 (18,1)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(II), 60 °C	81,2 (0,1)	69,6 (29,3)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(II), 90 °C	48,5 (2,2)	36,6 (1,4)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(III), 60 °C	105,1 (0,4)	104,4 (0,4)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Fe(III), 90 °C	105,5 (0,2)	103,2 (0,2)
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Cu(II), 60 °C	30,1 (0,2)	-
Fenylefrin 0,1 mg/ml med Cu(II), 90 °C	6,1 (5,0)	-
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø, AAPH, 60 °C	16,0 (6,2)	-
Fenylefrin 0,1 mg/ml i oksidativt miljø, AAPH, 90 °C	41,0 (37,5)	-

Gjenværende konsentrasjonen av fenylefrin etter degradering med toverdlig jern, base (pH 10), hydrogenperoksid og toverdlig kobber ved 60 °C i 24 timer, ble bestemt til henholdsvis 81,2 µg/ml (RSD: 0,1), 68,2 µg/ml (RSD: 2,6), 44,9 µg/ml (RSD: 0,6) og 30,1 µg/ml (RSD: 0,2). Disse prøvene hadde dermed et forholdsmessig lite relativt standardavvik, men en noe høy degradering. Oppbevaring av samme type prøver ved 90 °C viste seg å gi en gjenværende mengde fenylefrin på ≤ 48,5 µg/ml. Relativt standardavvik varierte fra 2,2-17,2 %.

Det ble ikke sett nedbrytning i prøver med treverdlig jern etter 48 timer. For andre prøver oppbevart i 48 timer var gjenværende mengde fenylefrin ≤ 69,6 µg/ml. Relativt

standardavvik varierte fra 1,3-29,3 %. Der en av prøvene for degraderingsmetoden hadde lavt standardavvik, for eksempel i prøvene med toverdlig jern oppbevart ved 90 °C, gjaldt det at en av de andre prøvene oppbevart ved lavere temperatur, eller den andre parallellen av prøven (for toverdlig jern og basisk degradering)), hadde høyt relativt standardavvik. Dette viser en sannsynlighet for problemer med degraderingsmetodens reproduserbarhet for samtlige degraderingsmetoder etter 48 timer.

Prøver oppbevart ved romtemperatur viste ingen degradering etter tilsetning av toverdlig jern. Likevel var det relative standardavviket høyt i en av prøvene. Tilsvarende prøver som ble tilsatt base (pH 10) (n=2), viste også høyt relativt standardavvik i en av prøvene. Degradering ved hjelp av base kan uansett vise seg å gi villedende resultater ved vurdering av ulike stabilisatorer da natriummetabisulfitt i et basisk miljø hovedsaklig vil foreligge som sulfitt (SO_3^{2-}), mens stabilisatoren fortrinnsvis vil foreligge på bisulfittformen (HSO_3^-) i preparatet der pH er mellom 3 og 4 (Figur 7: Syre-baselikevekter og dimerisering i vandig bisulfittløsning på side 24). Degradering ved hjelp av base er derfor ikke å foretrekke når en degraderingsmetode for fenylefrin skal velges.

Degraderingsmetoden bør være så effektiv at det vil være mulig å sammenligne flere måter å stabilisere preparatet på. Samtidig bør ikke nedbrytningen være så voldsom at betydelige sekundære reaksjoner forekommer. En degradering på ca. 10-15 % vil sannsynligvis holde sekundære reaksjoner på et lavt nivå, samtidig som degraderingen er godt detekterbar. Ønsket degraderingstid var ca. 24 timer da en raskere degraderingsmetode kunne tenkes å være mer sårbar med hensyn på reproduserbarhet. 24 timer er dessuten egnet med tanke på laboratoriearbeid over flere dager. Det ble bestemt å se på degradering ved hjelp av varme før en eventuell videreutvikling av en degraderingsmetode ved bruk av toverdlig jern eller hydrogenperoksid, da reaksjonene så ut til å foregå med noe høy hastighet og de fleste prøvene ga store relative standardavvik ved HPLC-analysen. Ved bruk av varme som stressfaktor vil man også ha fordelen av å kunne studere reelle formuleringer – ikke formuleringer tilsatt en stressfaktor. Man unngår også filtrering av løsninger og påvirkning av kolonnen grunnet bruk av sterke reagenser.

Det kan også bemerkes at bruk av azid og hydrogenperoksid viste at stoffet ble oksidert. Toverdig jern og toverdig kobber fremskynder degradering av fenylefrin. Dette understreker nødvendigheten av god vannkvalitet med hensyn på innhold av spormetaller ved produksjon av fenylefrinpreparatet.

4.2.1.2 Varmedegradering: innledende forsøk

Forsøk 1: 60 °C og 40 % RH, 105 dager

For å se om varme medførte akselerert nedbrytning av fenylefrin, ble ampuller av ferdig preparat satt til oppbevaring ved 60 °C og 40 % relativ luftfuktighet da utviklingen av analysemetoden startet. Man håpet også at forsøket ville gi degraderingsprodukter slik at ampullene kunne benyttes ved validering av spesifisiteten til HPLC-metoden.

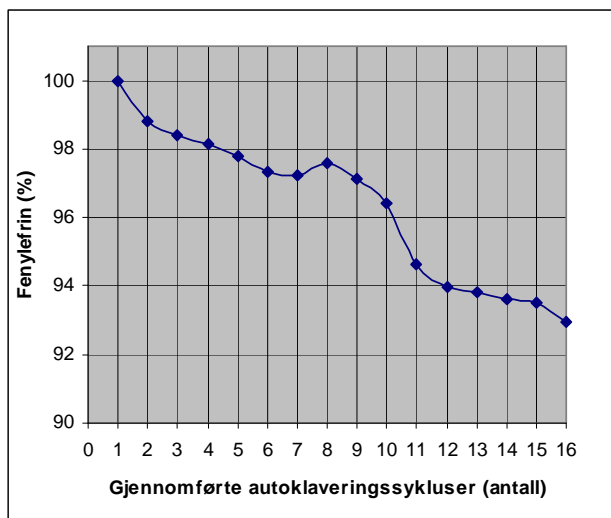
Resultatene etter 105 dager viser en noe høy konsentrasjon av fenylefrin med 0,106 mg/ml, men tilsynelatende ingen degradering. Siden analysemetoden ikke var ferdig utviklet da ampullene ble lagt til oppbevaring, er konsentrasjonen ved tid 0 ikke bestemt. Kontroll av veieutskrift mot hovedforskrift viser imidlertid ingen avvik, og teoretisk konsentrasjon av fenylefrinhydroklorid er 0,100 mg/ml. Et avvik på +6 % i konsentrasjonen av fenylefrin kan skyldes en fordampning av væske før analysen ble utført da preparatet etter lengre tids oppbevaring vil ha temperatur tilsvarende temperaturen i klimaskapet (60 °C).

Oppbevaring av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ved 60 °C i 105 dager var ikke tilstrekkelig til å degradere preparatet, og det ble derfor gjort ytterligere forsøk ved økt temperatur. Virkningen av varmebehandling ved 121 °C ble undersøkt ved bruk av standard autoklaveringscykluser på 16 minutter (se påfølgende forsøk).

Forsøk 2: Varmebehandling ved autoklaveringscykluser

En prøveløsning av fenylefrin 0,1 mg/ml i 10 ml hetteglass ble autoklavert ved 121 °C i 16 minutter. Etter første autoklaveringscyklus ble ett hetteglass tatt ut og konsentrasjonen bestemt. De gjenværende prøvene ble autoklavert videre. Prosedyren ble gjentatt 15 ganger, slik at siste hetteglass ble autoklavert totalt 16 ganger.

Konsentrasjonen gikk ned med 7 % fra første gjennomførte autoklaveringsyklus til sekstende gjennomførte autoklaveringsyklus. Økt antall autoklaveringsyklus gir som forventet økt nedbrytning av fenylefrin (Figur 14).



Figur 14: Nedgang i fenylefrinkonsentrasjon med økt antall autoklaveringsyklus. Ett hetteglass ble konsentrasjonsbestemt etter hver syklus.

Degraderingen bør være så høy at det vil være mulig å sammenligne flere måter å beskytte preparatet på, samtidig som det ikke ønskes en degradering som er så voldsom at det øker bidraget fra sekundære reaksjoner. Ønsket degradering var i utgangspunktet 10-15 %. 16 autoklaveringsyklus til 16 minutter gir resultater som nærmer seg dette, men for å forenkle degraderingsprosedyren, ønskes et varmebehandlingsprogram som kan kjøres sammenhengende. 16 autoklaveringsyklus til 16 minutter tilsvarer ca. 5 timer med varmebehandling.

Forsøk 3: 121 °C i 5 timer

For å unngå variasjoner i oppbevaringstid og -betingelser mellom hver autoklaving, ble det gjennomført en sammenhengende varmebehandling ved 121 °C i 5 timer. Dette ble utført for å se om man ville oppnå en tilstrekkelig degradering av fenylefrin. Resultatet ble en konsentrasjonsnedgang på 4,4 % i løsninger *uten* natriummetabisulfitt (Tabell 38, side 72). Nedgangen i løsninger *med* natriummetabisulfitt var kun 2,1 %. Dette ble ansett å være for lite siden

nedbrytningsmetoden skulle benyttes til å vurdere forskjellige formuleringer med hensyn på stabilitet. Det ble derfor bestemt å gjennomføre to varmebehandlingssykluser à 5 timer, til sammen 10 timer varmebehandling ved 121 °C.

Tabell 38: Resultater etter 5-timers varmebehandlingssyklus ved 121 °C. Standardavviket er oppgitt for prøver med n=6)

Fenylefrin (µg/ml)	Varme-behandling	Fenylefrin (µg/ml; %)	
		Konsentrasjon av natriummetabisulfitt (µg/ml)	
		0	0,5
100	<i>Før (n=1)</i>	99,2	-
	<i>Etter (n=6) (%)</i>	94,8 ± 0,3 (95,6 ± 0,3)	-
100	<i>Før (n=1)</i>	-	99,8
	<i>Etter (n=6) (%)</i>	-	97,7 ± 0,4 (97,9 ± 0,4)
0	<i>Før (n=1)</i>	-	0
	<i>Etter (n=1) (%)</i>	-	0 (0)

10 timer varmebehandling ved 121 °C er utvilsomt en hard behandling som preparatet aldri vil utsettes for. *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* autoklaveres imidlertid i 16 minutter ved 121 °C, og utsettes dermed for økt temperatur. Akselerert degradering ved varme ligger dermed nært opp mot normal nedbrytning. Ved bruk av pH-endring, tilsetning av metallioner og lignende kan man få reaksjonsmekanismer som ikke vil forekomme under normale betingelser.

Akselererte holdbarhetsstudier for fenylefrin vil utføres med 10 timers varmebehandling ved 121 °C, da reaksjonene i prøvene går meget sakte både ved romtemperatur og ved moderat hevet temperatur.

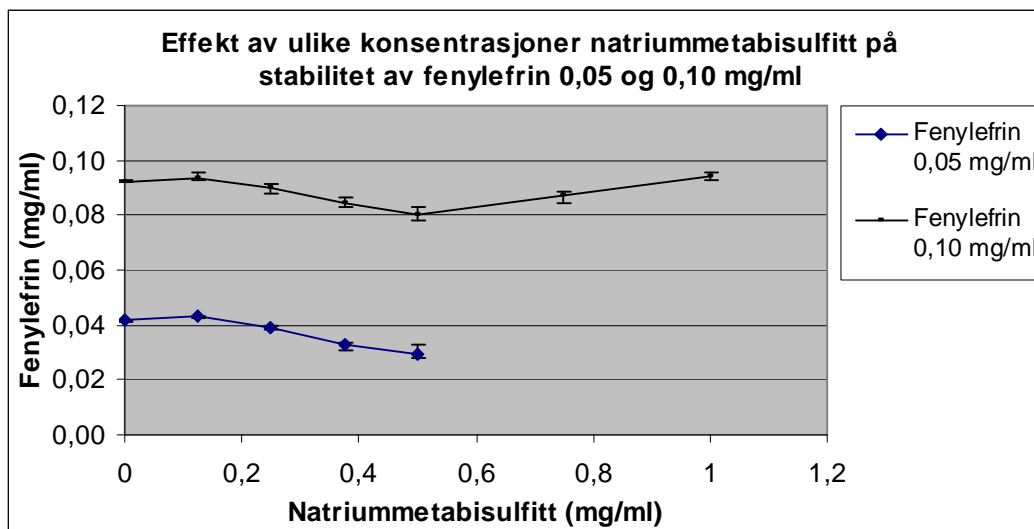
4.3 FORMULERING, PRODUKSJONSPROSESS OG STRESSTESTING

Alle studier i kapittel 4.3 er utført ved forhøyet temperatur. Temperaturinnvirkning på reaksjonshastighet er kommentert i kapittel 1.2.4.3 (side 16). Tilførsel av mye energi i form av økt temperatur kan gjøre at en høy aktiveringsenergi, som vanligvis vil hindre en reaksjon i å forløpe ved romtemperatur, vil kunne overgå slik at nye reaksjoner finner sted. Resultatene fra forsøkene utført ved forhøyet temperatur over lang tid

(121 °C, 10 timer) bør derfor verifiseres ved normale oppbevaringsbetingelser (se 3.5.3 Langtidsstabilitet, side 58).

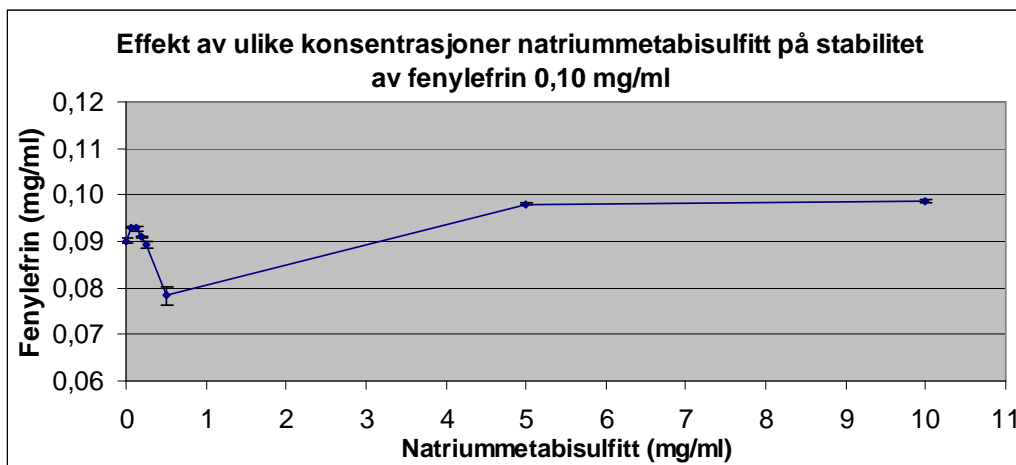
4.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet

Effekten av natriummetabisulfitt på stabiliteten av fenylefrin ble testet ut ved to konsentrasjoner av fenylefrinhydroklorid; 0,05 mg/ml og 0,10 mg/ml. Resultatene peker mot at man finner samme absolutte nedgang i fenylefrinkonsentrasjon ved samme konsentrasjon av natriummetabisulfitt (Figur 15) (Vedlegg 9: Tabell med resultater fra varmebehandlede fenylefrinløsninger med ulike mengder natriummetabisulfitt, side 115).



Figur 15: Gjenværende mengde fenylefrin som funksjon av natriummetabisulfittkonsentrasjon etter varmebehandling ved 121 °C i 10 timer. Høyeste og laveste verdi er angitt for hvert punkt (n= 3 eller 6 for samtlige løsninger). Dagens preparat inneholder 0,5 mg/ml natriummetabisulfitt.

I tre forsøk ble konsentrasjoner av natriummetabisulfitt opp til 10,0 mg/ml prøvet ut (Figur 15, side 73 og Figur 16, side 74). I preparatet som i dag produseres på Sykehusapoteket ved Rikshospitalet er konsentrasjonen av natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml. Denne konsentrasjonen av natriummetabisulfitt ga klart dårligst stabilitet i alle de tre forsøkene; i to forsøk med fenylefrin 0,10 mg/ml og natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml var gjenværende mengde fenylefrin henholdsvis 79,7 % (Figur 15) og 75,8 % (Figur 16) etter gjennomført varmebehandling.



Figur 16: Gjenværende mengde fenylefrin som funksjon av natriummetabisulfittkonsentrasjon etter varmebehandling ved 121 °C i 10 timer. Høyeste og laveste verdi er avmerket for hvert punkt (n=3). Dagens preparat inneholder 0,5 mg/ml natriummetabisulfitt.

Ved lavere konsentrasjon av natriummetabisulfitt enn dagens konsentrasjon (< 0,5 mg/ml), ble stabiliteten under varmebehandling forbedret. En natriummetabisulfittkonsentrasjon på 0,0625 mg/ml ga en konsentrasjon av gjenværende mengde fenylefrin på 90,4 % (Figur 16). Natriummetabisulfitt i en konsentrasjon på 0,125 mg/ml ga henholdsvis 93,3 % (Figur 15) og 90,0 % (Figur 16) gjenværende mengde fenylefrin. I løsninger med natriummetabisulfittkonsentrasjoner mellom 0,125 og 0,5 mg/ml sees igjen en nedadgående trend i stabilitet under varmebehandlingen (Figur 15 og Figur 16).

Normalkonsentrasjon av natriummetabisulfitt i parenterale preparater er 0,1-10 mg/ml (Nema et al., 2002; Stewart, 2003). Bisulfittkonsentrasjonen i *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* ligger i nedre del av normalområdet. Høyest gjenværende mengde fenylefrin etter varmebehandling ble observert i løsninger med natriummetabisulfitt 10 mg/ml (Figur 16). Forsøksrekken der natriummetabisulfitt 10 mg/ml inngår, innbefatter ikke konsentrasjoner av natriummetabisulfitt mellom 0,5 og 5 mg/ml. Hvor raskt en forbedring i stabiliteten av fenylefrin kommer med økende natriummetabisulfittkonsentrasjon fremgår dermed ikke klart. I Figur 15 er imidlertid konsentrasjonene 0,75 og 1 mg/ml benyttet. Ved disse konsentrasjonene oppnås en gjenværende mengde fenylefrin på henholdsvis 85,8 % og 92,4 % (Figur 15). En økning til 5 og 10 mg/ml ga en liten økning i gjenværende mengde fenylefrin til henholdsvis 94,4 % og 95,0 % (Figur 16). Dette kan tyde på en raskt forbedret stabilitet av fenylefrin ved en økning av natriummetabisulfittkonsentrasjonen over

0,5 mg/ml. Samtidig observeres det at løsninger uten natriummetabisulfitt i samtlige forsøk viste bedre stabilitet enn løsninger med den mengden natriummetabisulfitt som finnes i dagens preparat. Prøver av fenylefrin 0,1 mg/ml uten natriummetabisulfitt inneholdt i to forsøk henholdsvis 91,7 % (Figur 15) og 86,4 % (Figur 16) virkestoff etter varmebehandling. Tilsvarende resultat for prøver av fenylefrin 0,05 mg/ml var 83,0 % (Figur 15).

Som tidligere omtalt (kapittel 1.3.2 Hjelpstoffer, side 23), bør natriummetabisulfitt ideelt sett unngås som hjelpestoff i et parenteralt produkt. Om denne antioksidanten likevel må benyttes i formuleringen, skal konsentrasjonen være berettiget med tanke på effektivitet og sikkerhet (Nema et al., 2002). Det vil derfor være ønskelig å redusere konsentrasjonen av natriummetabisulfitt, eller å fjerne stoffet fra formuleringen, snarere enn å øke mengden. 10 timer (to perioder à 5 timer) varmebehandlingen ved 121 °C er som tidligere nevnt utvilsomt en hard behandling. Forskjellen på resultatene som ble oppnådd i løsninger med høyere og lavere konsentrasjon av natriummetabisulfitt enn det som benyttes i dagens preparat fremstår dermed som relativt små. Det bør derfor vurderes å redusere konsentrasjonen av natriummetabisulfitt til 0,125 mg/ml eller lavere, eventuelt å fjerne natriummetabisulfitt helt. Prøvene er ikke degasset, men resultatene som er diskutert over tyder på at løsninger av fenylefrin har god stabilitet selv uten at de er degasset.

Det er observert konsentrasjonsavhengige reaksjoner i preparatet. Flere konkurrerende prosesser kan foregå samtidig i et preparat. Konsentrasjon av virkestoff så vel som andre innholdsstoffer (antioksidanter, buffere o.l), mengde oppløst oksygen, tilstedeværelse av spormetaller og temperatur er alle eksempler på faktorer som kan påvirke reaksjonene i forskjellige retninger. Natriummetabisulfitt er tilsatt preparatet som en antioksidant for å unngå oksidasjon. Det ser imidlertid ut til at en konsentrasjon på 0,5 mg/ml (mengden i dagens preparat) gjør at natriummetabisulfitt fungerer oksidativt og dermed gir en økt nedbrytning av preparatet fremfor å beskytte det. En økt stabilitet er sett ved 0,125 og 10 mg/ml, noe som tyder på at antioksidanteffekten dominerer ved disse konsentrasjonene. Kurveforløpene (Figur 15 og Figur 16) viser dermed et bunnpunkt ved dagens konsentrasjon av natriummetabisulfitt (0,5 mg/ml). Effekten bør bekreftes ved studier utført ved normale lagringsbetingelser (romtemperatur).

4.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet

Effekten av natriummetabisulfitt, dinatriumedetat og askorbinsyre på stabiliteten av fenylefrin ble undersøkt ved å analysere 18 løsninger av fenylefrinhydroklorid 0,10 mg/ml i 8,6 mg/ml natriumkloridoppløsning tilsatt de tre stoffene alene eller kombinert parvis. Prøvene ble varmebehandlet i 10 timer (to perioder à 5 timer) ved 121 °C. De ble ikke degasset før varmebehandlingen.

Gjenværende mengde fenylefrin i de varmebehandlede prøvene er vist på neste side (Tabell 39). Løsningene er rangert etter gjenværende mengde fenylefrin; en del løsninger som ble ødelagt under varmebehandlingen er ført opp nederst i tabellen. I en løsning *uten* stabilisator var det 91,7 % fenylefrin igjen etter varmebehandling (4.3.1 Figur 15, side 73) og denne løsningen er markert med en grå linje i tabellen (i to andre forsøk var gjenværende mengde fenylefrin i stabilisatorfrie løsninger henholdsvis 86,4 % (4.3.1 Figur 16, side 74) og 86,8 % (4.3.3 Tabell 39, side 77)). For å være aktuell for videre undersøkelser, må en stabilisator eller stabilisatorkombinasjon gi bedre stabilitet enn dette. Det er dermed ikke aktuelt å gå videre med enkeltstabilisatorer og kombinasjoner av stabilisatorer som er ført under den grå linjen i tabellen (Tabell 39).

Konsentrasjonen av natriummetabisulfitt i preparatet *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er i dag 0,5 mg/ml. Med to unntak hadde fenylefrin bedre stabilitet i samtlige løsninger som ikke ble ødelagt under varmedegraderingsprosessen, enn det løsninger med denne konsentrasjonen natriummetabisulfitt hadde. Andre forsøk utført i oppgaven har vist en lignende ugunstig effekt av denne konsentrasjonen natriummetabisulfitt (4.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet, side 73 og 4.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet, side 79). Den eneste prøveløsningen som viste betydelig lavere stabilitet enn løsningene med dagens mengde natriummetabisulfitt var kombinasjonen av 1 mg/ml dinatriumedetat og 0,2 mg/ml natriummetabisulfitt. Denne prøven inneholdt 74,8 % fenylefrin etter varmebehandlingen.

Tabell 39: Oversikt over resultater etter 10 timer varmebehandling av fenylefrin 0,1 mg/ml ved 121 °C etter tilsetning av ulike enkeltstabilisatorer og kombinasjoner av stabilisatorer (n=3). Tabellen er rangert etter prosent gjenværende fenylefrin. Grå linje viser resultatet for en fenylefrinløsning uten stabilisator. Formuleringer som ble ødelagt under varmebehandlingen er ført opp nederst i tabellen.

Konsentrasjon (mg/ml)			Gjenværende mengde fenylefrin (%); gjennomsnitt (lavest-høyest)
<i>Dinatrium- edetat</i>	<i>Natrium- metabisulfitt</i>	<i>Askorbinsyre</i>	
0,1	10		98,8 (98,7-98,9)
	10	2	97,0 (95,9-98,1)
0,1			96,7 (96,0-97,4)
0,5			95,2 (95,0-95,4)
1			95,0 (94,2-95,7)
1	10		94,7 (94,7-94,8)
	0,125*		93,3 (91,9-95,0)
	1*		92,5 (91,3-94,3)
-	_*	-	91,7 (91,3-92,1)
	0,25*		89,1 (87,4-90,4)
1		2	87,6 (85,2-88,9)
	0,75*		85,9 (83,2-87,4)
	0,375*		83,8 (82,1-85,9)
	0,5*		79,7 (77,6-82,0)
0,1	0,2		78,7 (78,0-79,2)
1	0,2		74,8 (74,8-74,8)
		2	_*
		20	-
		40	-
0,1		2	-
1		40	-
0,1		40	-
	0,2	2	-
	10	40	-
	0,2	40	-

*prøver som kun er stabilisert med natriummetabisulfitt og prøven som ikke er stabilisert er hentet fra Tabell 17, side 43. Resultatene for de samme prøvene er også vist i Figur 15, side 73. Alle prøver i Tabell 39 er analysert samme dag.

**Konsentrasjonen er ikke bestemt grunnet ødelagt emballasje under varmebehandling eller høy grad av utfelling og/eller høy grad av missfarging

Best stabilitet av fenylefrin, med 98,8 % gjenværende mengde etter varmebehandling, ble vist i en løsning stabilisert med en kombinasjon av lav konsentrasjon av dinatriumedetat og høy konsentrasjon av natriummetabisulfitt (Tabell 39). Som tidligere nevnt kan dinatriumedetat ha en synergistisk effekt sammen med andre antioksidanter (1.3.2 Hjelpstoffer, side 23). En kombinasjon av dinatriumedetat 0,1 mg/ml og natriummetabisulfitt 10 mg/ml oppnår noe bedre stabilitet sammen (98,8 % gjenværende fenylefrin) enn det stoffene gjør hver for seg; dinatriumedetat

0,1 mg/ml inneholdt 96,7 % gjenværende fenylefrin, mens det i løsninger med natriummetabisulfitt 10 mg/ml var 95 % gjenværende fenylefrin (Vedlegg 9: Tabell med resultater fra varmebehandlede fenylefrinløsninger med ulike mengder natriummetabisulfitt, side 115).

Løsninger med dinatriumedetat som eneste stabilisator viste også god stabilitet. Om reproduserbarheten til HPLC-metoden tas med i beregningen, er det ikke forskjell på stabiliteten av fenylefrin i løsninger med 0,1 mg/ml og 1 mg/ml av denne chelatoren (Tabell 19, side 45). En mulig forklaring på dette er at mengden spormetaller i fenylefrinløsningen er lav, og at en økning utover 0,1 mg/ml av dinatriumedetat dermed ikke har ytterligere effekt. Om det blir aktuelt å benytte dinatriumedetat som eneste stabilisator i et fenylefrinpreparat med en konsentrasjon av fenylefrin på 0,1 mg/ml, bør derfor en lav konsentrasjon av dinatriumedetat velges. Lavest mulig innhold tilsetningsstoffer er alltid å foretrekke i parenterale preparater.

Resultatene virket lovende siden mange prøveløsninger viste betydelig bedre stabilitet enn løsningen med dagens mengde natriummetabisulfitt (0,5 mg/ml). Stabiliteten i løsninger uten stabilisator var imidlertid også god sammenlignet med denne løsningen. Siden forsøket ble gjort under ekstreme betingelser var det derfor av interesse å studere om formuleringsseffektene også var av betydning under normale betingelser. I det videre arbeidet ble det derfor laget en pilotbatch av fire fenylefrinløsninger med natriummetabisulfitt (to konsentrasjoner) og dinatriumedetat (to konsentrasjoner), samt en løsning uten stabilisator (4.5.3.1 Pilotbatch, side 97). Disse løsningene ble imidlertid gasset med nitrogen da det var forventet at nitrogengassing av løsninger kunne gi økt holdbarhet siden det tidligere er rapportert at fenylefrin blir oksidert i løsning (1.2.4.1 Oksidasjon, side 14).

Samtlige løsninger i dette forsøket som kun inneholdt askorbinsyre som stabilisator var sterkt missfarget og/eller hadde fått ødelagt emballasjen under varmebehandlingen (proppen hadde sprukket). Dette bekrefter tidligere rapporter om inkompatibilitet mellom fenylefrin og askorbinsyre. Enkelte løsninger som inneholdt en kombinasjon av askorbinsyre og natriummetabisulfitt eller dinatriumedetat viste også sterk missfarging og/eller ødelagt emballasje. De fleste løsningene som inneholdt askorbinsyre alene eller i kombinasjon med andre stabilisatorer ga derfor et upålitelig svar og ingen verdi for gjenværende mengde fenylefrin er derfor oppført i tabellen

(Tabell 39, side 77). Grunnen til at proppene på hetteglassene av og til sprakk når løsningene inneholdt askorbinsyre kan være at det har blitt utviklet karbondioksid – det er rapportert at askorbinsyre kan danne karbondioksid når stoffet brytes ned i anaerobt miljø (Figur 9, side 27). Med den langvarige varmebehandlingen som ble brukt i dette forsøket er det mulig at alt oksygenet er blitt forbrukt og at askorbinsyre har blitt brutt ned i et miljø med lavt nivå av oksygen.

Om en relativt høy konsentrasjon av natriummetabisulfitt (10 mg/ml) eller dinatriumedetat (1 mg/ml) ble tilsatt sammen med en lav konsentrasjon av askorbinsyre viste imidlertid fenylefrinløsningen seg å ha god eller relativt god stabilitet, med en gjenværende mengde fenylefrin på henholdsvis 97,0 og 87,6 %. Disse løsningene ble ikke missfarget. Det var likevel ikke aktuelt å gå videre med løsninger som inneholdt askorbinsyre siden stoffet er rapportert å være inkompatibelt med fenylefrin. Inkompatibiliteten så ut til å inntreffe ved mange askorbinsyre konsentrasjoner i forsøkene vist her. Om inkompatibilitet mellom askorbinsyre og fenylefrin ønskes bekreftet eller avkreftet, kan dette undersøkes ved bruk av spektrofotometriske metoder. Dette ble ikke gjort i oppgaven.

4.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet

Effekten av nitrogengassing på stabilitet av fenylefrinprøver med og uten natriummetabisulfitt ble undersøkt ved å analysere to løsninger som inneholdt henholdsvis fenylefrinhydroklorid 0,10 mg/ml i natriumkloridoppløsning 8,6 mg/ml ($n=12$), og fenylefrinhydroklorid 0,10 mg/ml i natriumkloridoppløsning 8,6 mg/ml tilsatt natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml ($n=12$). Halvparten av løsningene med ($n=6$) og uten ($n=6$) natriummetabisulfitt ble degasset i 20 sekunder ved høyeste mulige hastighet som ikke ga sprut fra løsningene. Gasshastigheten var da under 1 L/min. Skalaen på gasshastighetsmåleren begynner på 1 L/min, og gjør dermed at gasshastighet ikke kan oppgis. Degassingtid og gasshastighet ble bestemt i et eget forsøk (resultater ikke vist).

Klart dårligst stabilitet med $76,3 \pm 2,4$ % gjenværende fenylefrin etter varmebehandling ble observert i løsninger som inneholdt natriummetabisulfitt når prøvene ikke ble degasset (Tabell 40, side 80). Stabiliteten ble kraftig forbedret til $92,7 \pm 0,9$ % gjenværende fenylefrin ved gassing med nitrogen. Resultatene for

degassede og ikke degassede løsninger med natriummetabisulfitt var signifikant forskjellig med $p < 0,05$.

Tabell 40: Virkning av natriummetabisulfitt og nitrogengassing på stabilitet av fenylefrin 0,1 mg/ml etter varmebehandling ved 121 °C i 10 timer.

Antioksidant	Fenylefrin (% av utgangskonsentrasjon); gjennomsnitt \pm SD (n=6)	
	Ikke degasset	Degasset (N ₂)
Ingen	86,8 \pm 0,3	90,3 \pm 0,7
Natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml	76,3 \pm 2,4	92,7 \pm 0,9

I løsningene uten natriummetabisulfitt var forskjellen mindre, men også her ble det observert en bedret stabilitet i prøver som ble degasset. Løsninger som ikke ble degasset inneholdt 86,8 \pm 0,3 % fenylefrin etter varmebehandlingen, mens tilsvarende innhold av fenylefrin i prøver som ble degasset var 90,3 \pm 0,7 % (Tabell 40). Resultatene for degassede og ikke degassede løsninger var signifikant forskjellige med $p < 0,05$.

Sammenligning av degassede prøver med og uten natriummetabisulfitt viser signifikant forskjellige resultater med $p < 0,05$. Det samme gjelder for prøver som ikke ble degasset.

I preparatet som i dag produseres på Sykehusapoteket ved Rikshospitalet er konsentrasjonen av natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml. Vannet som benyttes i rutineproduksjonen (ca. 20 L) degasses i 10 minutter før virkestoff og hjelpestoffer tilblandes (Vedlegg 1: Hovedforskrift for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* per 15.mars 2007, side 106). Løsningen degasses så i 10 minutter etter blanding. Deretter filtreres løsningen over på en mellomkolbe som er degasset 2 minutter på forhånd. 5 ml ampuller degasses før fylling med fenylefrinløsning. Gasshastighet for nitrogen er ikke angitt (se kommentar i kapittel 4.4, side 81).

Forsøket viste at degassing er særlig nødvendig når løsningen inneholder natriummetabisulfitt. Natriummetabisulfitt har en oksidativ virkning når løsningen ikke er degasset, noe som innebærer at natriummetabisulfitt vil gi økt degradering av fenylefrin om løsningen ikke degasses tilstrekkelig. Om løsningen ikke skal degasses, bør den derfor ikke inneholde natriummetabisulfitt. Når løsningene ble degasset, var mengden gjenværende fenylefrin etter varmebehandling relativt lik i løsninger med

(92,7±0,9 %) og uten (90,3±0,7 %) natriummetabisulfitt. Som tidligere nevnt (1.3.2 Hjelpstoffer, side 23) er natriummetabisulfitt uønsket som antioksidant i parenterale preparater, og det bør vurderes å fjerne natriummetabisulfitt fra preparatet. Effekten av stoffet bør imidlertid også studeres i langtidsholdbarhetsstudier ved normale oppbevaringsbetingelser. Samtidig bør en standardisert degassingsprosedyre utvikles.

4.4 DEGASSING AV FYSIOLOGISK SALTVANN

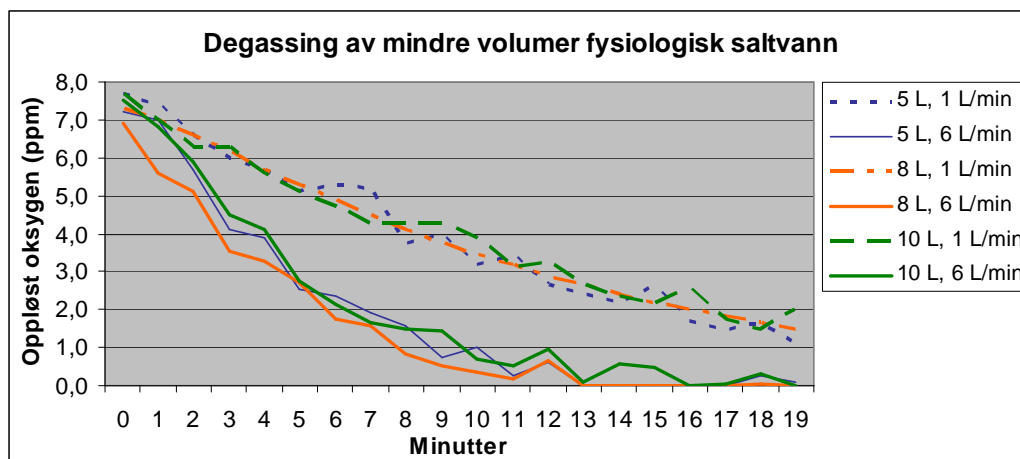
Preparater kan gjennombobles med nitrogen som et alternativ, eller et tillegg til, bruk av antioksidanter. Oksygenet i løsningen byttes med inert nitrogen – løsningen ”degasses”. Degassing bør foregå i alle trinn av produksjonsprosessen da oksygen hele tiden vil tilblandes og løses i væske. Mange av Rikshospitalets preparater degasses, men degassing er ikke standardisert – produksjonsforskrifter kan for eksempel henviser til at løsninger skal gjennombobles med nitrogen med en hastighet som ligner ”kraftig koking”. Gasshastighet 3 L/min ble vurdert å tilsvare slik ”kraftig koking” i et forforsøk der tekniker og farmasøyt fra produksjonsavdelingen ble bedt om å spesifisere dette uttrykket ved bruk av utstyrsoppsettet som senere ble benyttet i oppgaven (Figur 12, side 56). Det var ønskelig å standardisere degassingsprosessen slik at man deretter kunne undersøke hvilken effekt degassing har på stabiliteten av fenylefrin.

Det har tidligere vært gjort undersøkelser omkring degassingsrutiner ved apotekets produksjon (Brustugun, 1999). Disse undersøkelsene omfattet imidlertid ikke måling av tilført gassmengde og de var derfor vanskelige å standardisere.

Alle forsøk i denne oppgaven ble utført i 0,9 % (w/v) natriumklorid fordi løsninger som skal injiseres bør være isotone. Tilsetning av salter i væske fører dessuten generelt til en lavere løselighet av gass i væske, såkalt ”utsalting” av gasser (Roos, 1993). I et forforsøk ble det vist at det var liten eller ingen forskjell på resultater oppnådd ved gassing med og uten magnetrører (resultater er ikke vist). Siden bruk av magnetrører vil være naturlig under en produksjon, ble alle forsøk vist i oppgaven gjort med magnetrører. Før start av degassing var innholdet av oksygen i løsningene 6,9-7,7 ppm.

Forsøk 1: Degassing i mindre volumer (5-10 L i 12 L rundkolbe)

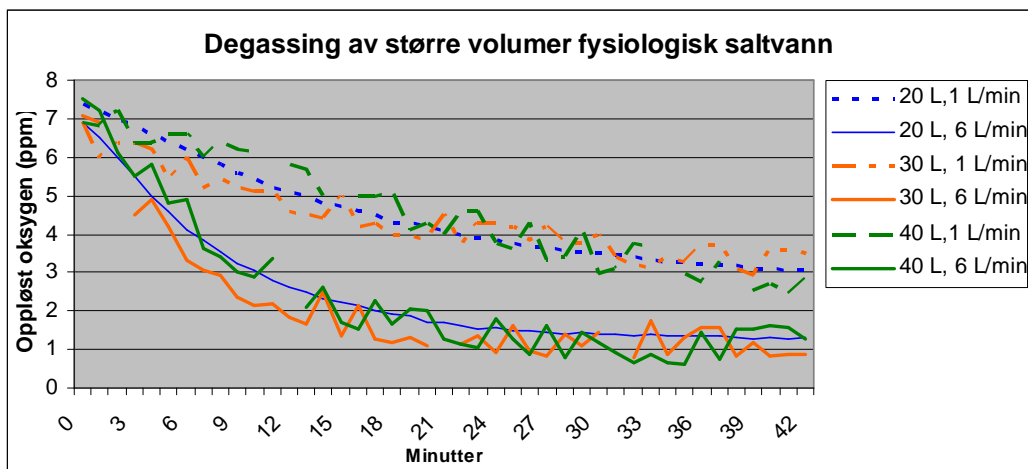
Degassing av 5 L, 8 L og 10 L 0,9 % (w/v) natriumklorid i en 12 L rundkolbe ved gasshastighet på 1 L/min, viste en jevn nedgang i oksygeninnhold (Figur 17, stiplet linje). Etter 20 minutter var oksygeninnholdet ca. 1,5 ppm. Degassing av de samme volumene løsning ved gasshastighet 6 L/min viste en raskere nedgang i oksygeninnhold frem til ca. 7 minutter etter start (Figur 17, heltrukket linje). Etter dette punktet flater kurven noe ut. Oksygeninnholdet fortsetter imidlertid å synke jevnt frem til ca. 16 minutter. Ved 16 minutter er ikke oksygeninnholdet detekterbart (oksygenmåleren viste 0,0 ppm).



Figur 17: Nitrogengassing av 5-10 L 0,9 % (w/v) natriumklorid med gassingshastighet 1 L/min (stiplet linje) og 6 L/min (heltrukket linje) (n=1)

Forsøk 2: Degassing i større volumer (20-40 L i 50 L ståltank)

Degassing av 20 L, 30 L og 40 L 0,9 % (w/v) natriumklorid i en 50 L ståltank ved gasshastighet for nitrogen på 1 L/min viste en jevn nedgang i oksygeninnhold (Figur 18, stiplet linje, side 83). Etter 43 minutter var oksygeninnholdet ca. 3,2 ppm. Degassing av de samme volumene løsning ved gasshastighet på 6 L/min viste en raskere nedgang i oksygeninnhold frem til 11 minutter (Figur 18, heltrukket linje). Etter dette flater kurven noe ut og fra 23 minutter er kurven nærmest flat. Etter 43 minutter hadde løsningen en oksygenkonsentrasjon på ca. 1,3 ppm og loggingen ble avsluttet da målingene ikke hadde vist betydelig endring i oksygeninnhold de siste 20 minuttene.



Figur 18: Nitrogengassing av 20-40 L 0,9 % (w/v) natriumklorid med gasshastighet 1 L/min (stiplet linje) og 6 L/min (heltrukket linje) (n=1)

Vurdering av degassing i større og mindre volumer:

Ved degassing av 5-10 L væske i en 12 L rundkolbe og 20-40 L væske i en 50 L ståltank, ble det observert en klar forskjell ved bruk av ulike gasshastigheter. Økt gasshastighet viste raskere nedgang i oksygennivået. Ikke-detektèrbart oksygenivå ble sett i rundkolben på 12 L etter ca. 16 minutter ved bruk av en gasshastighet på 6 L/min. En slik nedgang ble ikke sett med gasshastighet 1 L/min i samme beholder.

Et ikke-detektèrbart oksygenivå ble ikke oppnådd i 50 L ståltank for noen av volumene på 20-40 L. Laveste nivå av oksygen i ståltanken ble målt til 1,3 ppm etter 30 minutter ved gasshastighet 6 L/min.

Det er mulig å oppnå et ikke-detektèrbart nivå av oksygen i relativt små væskevolumer (5-10 L) ved høyere gasshastighet. Det anbefales bruk av høy gasshastighet (6 L/min eller høyere) ved gassing av væsker med nitrogen. Høyere gasshastighet gir raskere og sterkere nedgang i oksygeninnhold, og degassing kan foregå på kortere tid. Kort degassingstid er særlig fordelaktig ved produksjon i et aseptisk miljø.

I løsninger der et lavt oksygeninnhold er kritisk bør det vurderes om man kan benytte et lavere produksjonsvolum, da forsøkene viste at et ikke-detektèrbart nivå av oksygen kun var oppnåelig i volumer på 5-10 L. Høyere gasshastighet enn 6 L/min kan eventuelt forsøkes i fremtiden for å se om lavere oksygeninnhold enn 1,3 ppm

kan oppnås ved degassing i 50 L ståltank (6 L/min var som nevnt høyeste mulige gasshastighet med den tilgjengelige gasshastighetsmåleren).

Forsøkene gjort i denne oppgaven viste at løsningsvolumer som det vil være naturlig å produsere i samme beholder, tilsynelatende trenger like lang degassingstid – uavhengig av væskevolum (løsningsvolum på henholdsvis 5, 8 og 10 L og 20, 30 og 40 L i samme beholder trengte omtrent lik degassingstid for å nå samme oksygenkonsentrasjon).

Roos (1993) har tidligere fremholdt at størrelsen på åpningen av beholderen er omvendt proporsjonal med tiden det tar å degasse løsningen i beholderen. Dette er også angitt å gjelde volumet over løsningen – ”headspace”; det skal ta lengre tid å degasse samme væskevolum i en beholder med stort ”headspace”, enn i en beholder med lite ”headspace” når åpningen på beholderne er like. Det bør derfor tilstrebes å benytte beholdere med minst mulig ”headspace”, og med minst mulig åpning.

4.5 LANGTIDSSTABILITETSTESTING

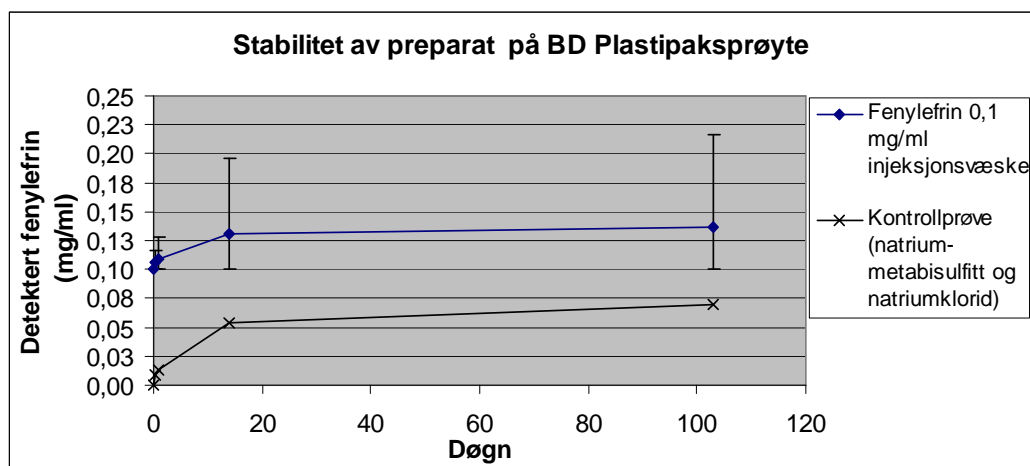
4.5.1 Stabilitet på sprøyte

Stabilitet av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* opptrukket på sprøyte ble undersøkt i to forsøk ved å fylle sprøyter av merkene BD Plastipak, Terumo og Codan med preparatet produsert ved Sykehusapoteket, Rikshospitalet (Tabell 22, side 47). Preparatet ble også oppbevart på hetteglass for å se på eventuell innvirkning fra plasten. Det ble dessuten laget kontrolløsninger uten fenylefrin som angitt i 3.5.1 (side 56). Alle prøvene ble oppbevart i klimaskap ved 22,5 °C og 40 % (forsøk 1) eller 60 % (forsøk 2) relativ luftfuktighet.

I første forsøk, som kun omfattet BD Plastipaksprøyter, ble prøver analysert ved start, etter 8 timer, 24 timer og 14 dager. Prøvene fra forsøk 2 ble i tillegg analysert etter 7 dager. For forsøk 1 ble det utført en tilleggsanalyse etter 103 dager for å undersøke utvikling over lang tid (det vil ellers ikke være naturlig å oppbevare preparatet på sprøyte i 103 dager).

Forsøket som kun innbefattet BD Plastipaksprøyter (den mest brukte sprøytetypen ved apoteket) viste at disse sprøytene skiller ut noe som absorberer UV-lys og som har

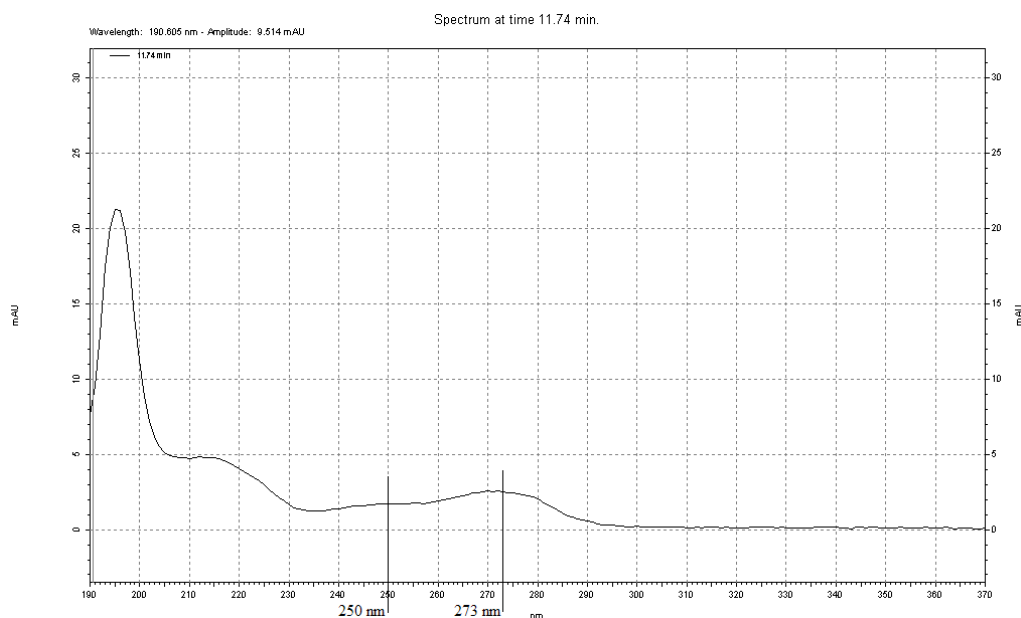
retensjonstid nær retensjonstiden for fenylefrin, siden konsentrasjonen av detektert fenylefrin tilsynelatende stiger over tid (Figur 19). UV-spekteret til prøvene oppbevart på BD Plastipaksprøytene (Figur 20, side 87) avviker dessuten fra fenylefrins spekter (Figur 21, side 87), hvilket underbygger teorien om at en ny substans er kommet til. Fenomenet forekom også i kontrollsprøyten, som hadde en detektert fenylefrinkonsentrasjon på 0,05 mg/ml etter 14 dager, skjønt den bare inneholdt natriummetabisulfitt og natriumklorid. UV-spekteret til substansen i kontrollprøven (Figur 22, side 88) ligner ikke spekteret til fenylefrin (Figur 21) eller UV-spekteret til en tilsvarende prøve oppbevart i hetteglass (Figur 23 (prøven er fra forsøk 2), side 88). Det ble gjort en analyse etter 103 dager for å undersøke om det var en videre utvikling, hvilket det var. Utskillelsen avtar imidlertid med tiden, og signalet til kontrollprøven tilsvarte etter 103 dager en konsentrasjon av detektert fenylefrin på 0,07 mg/ml. Det var stor forskjell i tilsynelatende økning av fenylefrinkonsentrasjon fra sprøyte til sprøyte, hvilket kan tolkes som at mengden stoff som trekkes ut fra BD Plastipaksprøytene varierer mye.



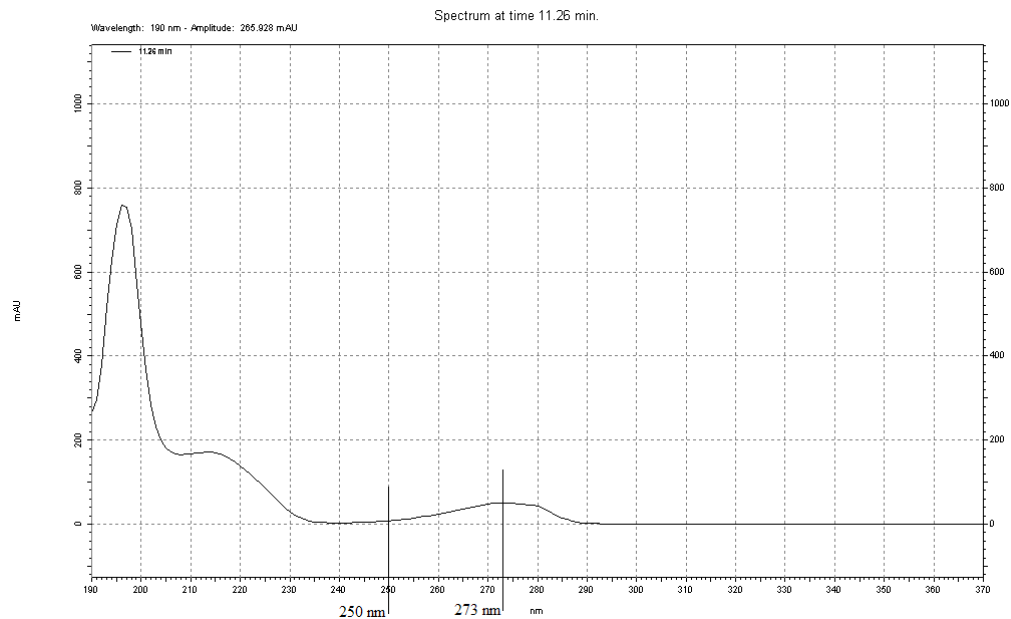
Figur 19: Oversikt over detektert fenylefrin i *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* (n=6) og kontrollprøve (n=1) som funksjon av antall dagers oppbevaring ved 22,5 °C og 40 % relativ luftfuktighet. Tilsynelatende økt konsentrasjon av fenylefrin skyldes sannsynligvis en forurensning fra sprøyten som interfererer med analysen.

Ved nærmere undersøkelse av UV-spektrene til kontrollprøvene, fremgår det at forurensningen har to toppe over 230 nm (Figur 22, side 88), henholdsvis ved 250 og 270 nm, som ikke finnes i en kontrollprøve oppbevart i hetteglass (Figur 23 (fra forsøk 2), side 88). Fenylefrin detekteres i analysemetoden ved 273 nm, og forurensningens topp ved 270 nm vil derfor interferere med HPLC-analysen siden

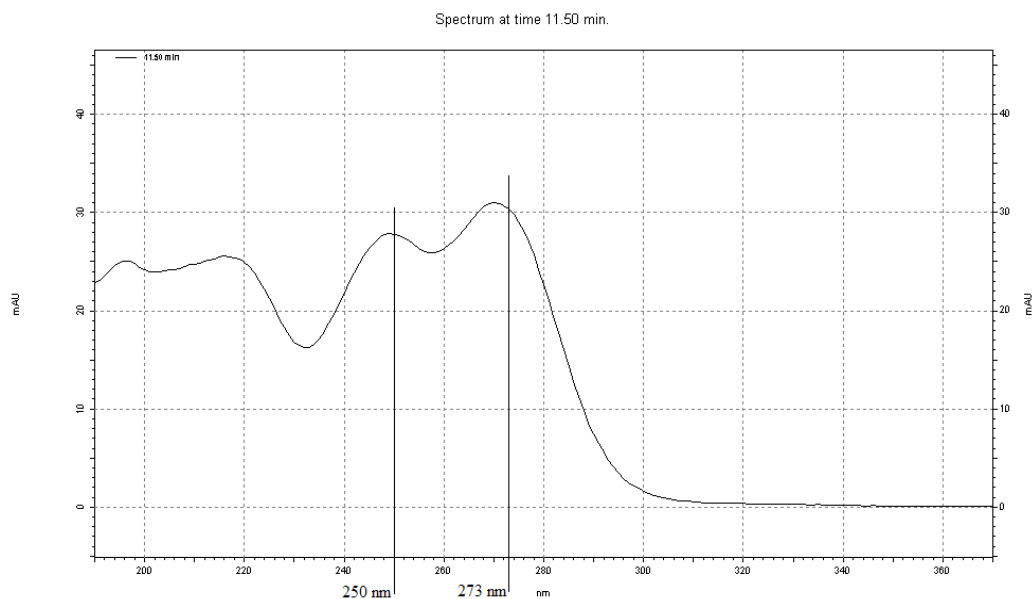
forurensningen eluerer ved samme tidspunkt som fenylefrin. Det er sannsynligvis ingen kjemisk interferens mellom forurensningen og fenylefrin, da dette trolig ville endret retensjonstiden til det nye stoffet. I Figur 20 (side 87) ser man ikke umiddelbart noe mistenkelig ved 273 nm, men toppen fra forurensningen ved 250 nm gjør at spekteret tatt opp av denne sprøyteprøven avviker fra spekteret tatt opp av prøver med innhold tilsvarende dagens preparat (Figur 21, side 87).



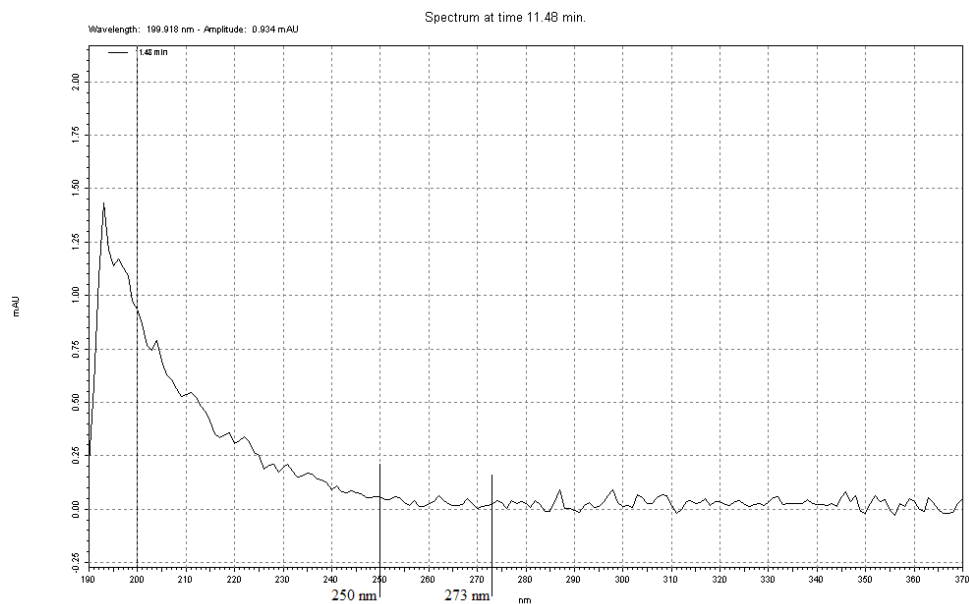
Figur 20: Absorbsjonsspekter av HPLC-eluat etter ca. 11 minutter av *Fenylefrin 0,1 mg/ml* injeksjonsvæske oppbevart i en BD Plastipaksprøyte i 14 dager. Bølgelengde 250 og 273 nm er avmerket.



Figur 21: Absorbsjonsspekter av HPLC-eluat etter ca. 11 minutter av en prøve med innhold tilsvarende dagens preparat. Prøven er nylaget og dermed ikke oppbevart på BP Plastipaksprøyte. Bølgelengde 250 og 273 nm er avmerket.



Figur 22: Absorbsjonsspekter av HPLC-eluat etter ca. 11 minutter av en kontrollprøve som i utgangspunktet kun inneholdt natriummetabisulfitt og natriumklorid i mengder tilsvarende mengdene i dagens preparat. Prøven er oppbevart i en BD Plastipaksprøyte i 14 dager. Bølgelengde 250 og 273 nm er avmerket.



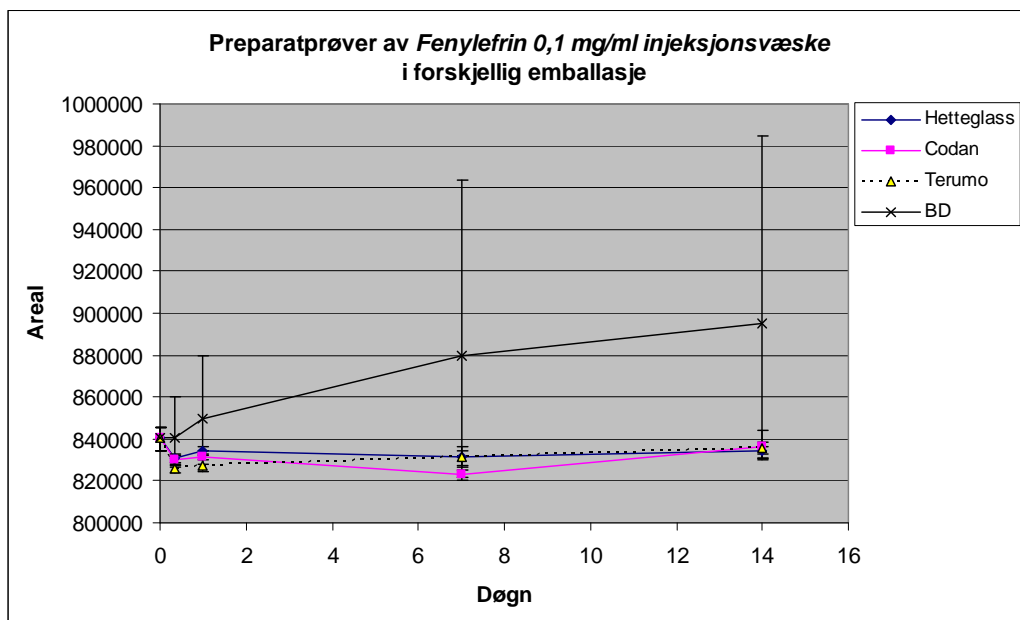
Figur 23: Absorbsjonsspekter av HPLC-eluat etter ca. 11 minutter av en kontrollprøve som kun inneholdt natriummetabisulfitt og natriumklorid i mengder tilsvarende mengdene i dagens preparat. Oppbevart i et hetteglass i 14 dager. Bølgelengde 250 og 273 nm er avmerket.

I et påfølgende forsøk ble flere sprøytemerker og kontrollprøver undersøkt for å se om fenomenet med økning i detektert fenylefrin også forekommer i sprøyter fra andre leverandører (Coadan og Terumo) og ikke bare i BD Plastipaksprøytene.

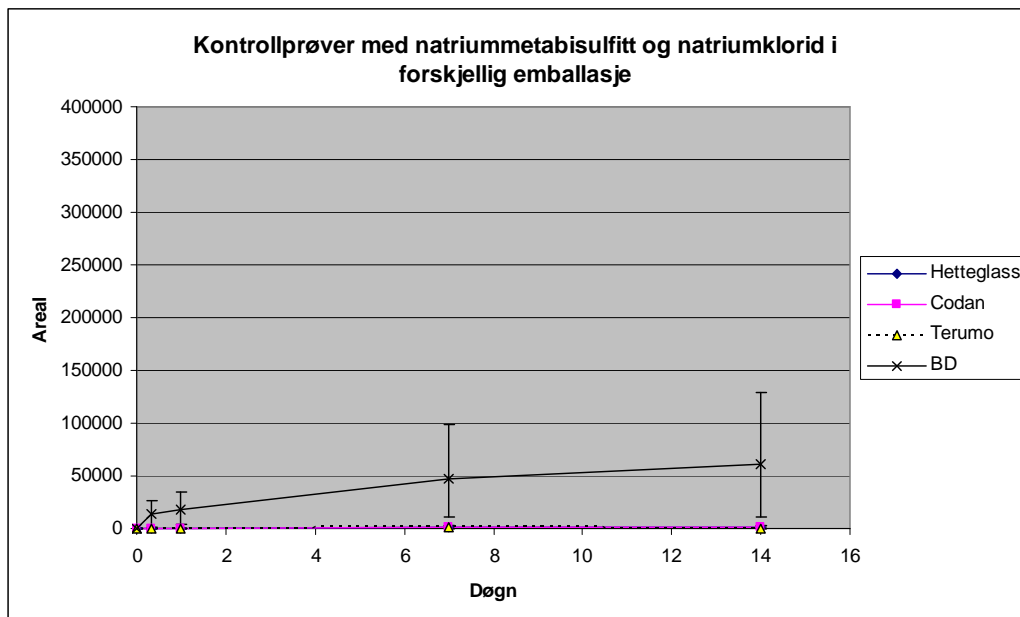
Preparatprøver, prøver med natriummetabisulfitt og natriumklorid og prøver med Milli-Q-vann oppbevart i BD Plastipaksprøyter, viste alle interaksjon med analysemetoden (tilsynelatende økning i fenylefrinkonsentrasjon) (Figur 24, side 90, og Figur 25 og Figur 26, side 91 (I figurene er arealet av den detekterte toppen vist (ikke fenylefrinkonsentrasjonen), fordi metoden ikke skiller fenylefrin og ekstrahert forurensning som kom fra sprøyten av merket BD Plastipak)). Det ble dermed ikke oppnådd stabilitetsdata for denne sprøytetypen. ”Økningen i detektert fenylefrin” var høyere i sprøyter som kun inneholdt vann (Figur 26), enn i sprøyter som inneholdt preparat. Fenomenet med økning i konsentrasjon og endring i spektrum finner ikke sted i sprøyter av merkene Terumo eller Codan, eller i hetteglass med klorbutylpropp. Codansprøytene utskiller små mengder av et stoff som har UV-absorpsjon, men som ikke interagerer med analysen av fenylefrin. Den nye toppen ble observert etter 6,5 min. Kjennskap til om det eventuelt utskilles stoffer som ikke absorberer UV-lys mangler for alle sprøytemerkene.

Den europeiske farmakopè definerer at polypropylen i materiale til parenterale preparater kan tilsettes et visst antall stoffer for å optimalisere polymerens kjemiske, fysiske og mekaniske egenskaper (European Pharmacopeia 5th, 2007, kapittel 3.1.6). Disse tilsetningsstoffene må velges fra listen som spesifiserer hvilke stoffer og maksimalt innhold av hvert stoff som kan benyttes. Listen står oppført i farmakopèen. Polypropylen kan inneholde maksimalt tre antioksidanter, en eller flere smøremidler eller antiblokkingsmidler og til sist titandioksid om materialet må gi beskyttelse mot lys. Emballasjen regnes som en del av en formulering og bør på generelt grunnlag ikke påvirke preparatet fysisk eller kjemisk (Kristensen, 2004). Det mangler kunnskap om hvorvidt preparatet i seg selv påvirkes, men graden av absorpsjon i analysen utført i forsøket indikerer at BD-sprøytene ikke er egnet der *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* blir opptrukket på sprøyte i noe tid før bruk, eller der innholdet i sprøyten skal benyttes over noe tid, da utskillelsen fra BD Plastipaksprøytene ser ut til å kunne finne sted før 8 timer. Andre BD-sprøyter (ikke testet) eller andre sprøytemerker som for eksempel Terumo bør vurderes i stedet. Terumosprøytene

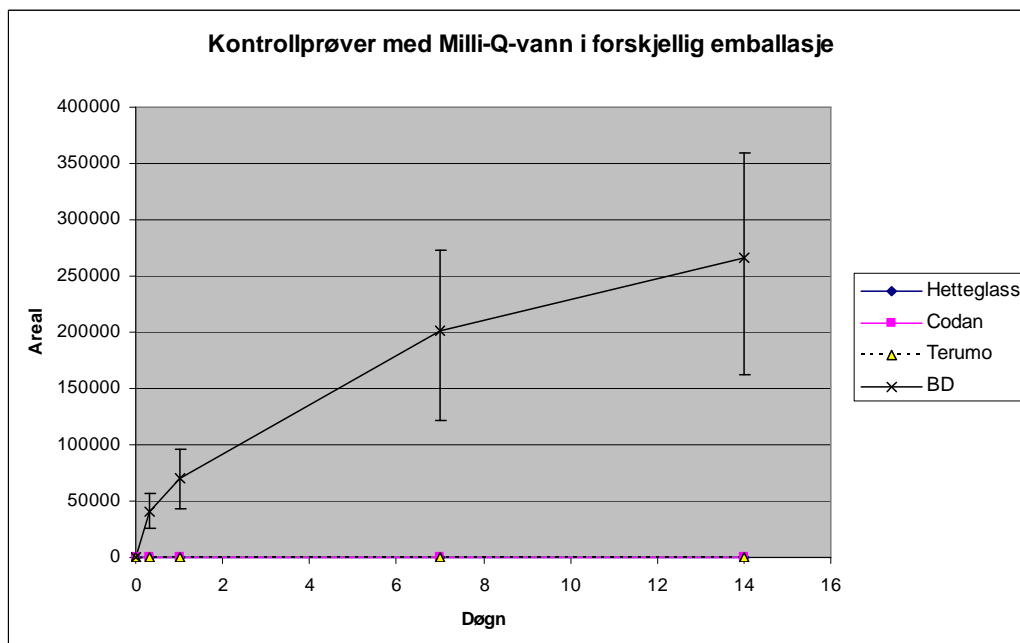
viste i likhet med Codansprøytene en stabil konsentrasjon av fenylefrin gjennom forsøkets 14 dager og det finnes derfor holdbarhetsdata for sprøyter av merket Terumo og Codan (se Vedlegg 10: Stabilitet av dagens preparat i hetteglass og i ulike sprøyter, side 116).



Figur 24: Areal av topp eluert ved fenylefrins elueringstid som funksjon av antall døgn ved 22,5 °C og 60 % RH på hetteglass og ulike sprøyter. Gjennomsnittlig verdi, med tilhørende lav og høy verdi, er avmerket i diagrammet. n=3 eller 6 for samtlige løsninger.



Figur 25: Areal av topp eluert ved fenylefrins elueringstid som funksjon av antall døgn ved 22,5 °C og 60 % RH på hetteglass og ulike sprøyter. Gjennomsnittlig verdi, med tilhørende lav og høy verdi, er avmerket i diagrammet. n=3 eller 6 for samtlige løsninger.



Figur 26: Areal av topp eluert ved fenylefrins elueringstid som funksjon av antall døgn ved 22,5 °C og 60 % RH på hetteglass og ulike sprøyter. Gjennomsnittlig verdi, med tilhørende lav og høy verdi, er avmerket i diagrammet. n=3 eller 6 for samtlige løsninger.

Det er nylig publisert en artikkel om stabilitet av fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml i fysiologisk saltvann til injeksjon på polypropylensprøyter (Kiser et al., 2007). Det konkluderes der med at injeksjonen er stabil i minst 30 dager ved romtemperatur.

Sprøytemerket som er brukt i studien er ikke oppgitt. BD Plastipaksprøytene, Terumosprøytene og Codansprøytene er, som sprøytene i Kiser et. al. sitt arbeid, laget av polypropylen (se Sprøyter, side 35). Bortsett fra at *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* inneholder natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml, er preparatet likt preparatet i artikkelen. Dette peker mot at preparatet laget ved Sykehusapoteket på Rikshospitalet også er stabilt i BD Plastipaksprøytene.

4.5.2 Stabilitet i lys

Gjennom holdbarhetstiden kan legemidler utsettes for både kunstig lampelys og vindusfiltrert sollys. Denne strålingen kan påvirke legemidlers stabilitet og det er av interesse å undersøke i hvilken grad legemidler påvirkes. Hovedmålet for testing med kunstige lyskilder på laboratoriet er å utføre tester ved akselererte betingelser som kan antas å ha god korrelasjon med naturlig eksponering (Boxhammer and Schönlein, 2004). ICH har standardiserte retningslinjer for undersøkelse av fotodegradering av nye legemiddelsubstanser og preparater (International Conference of Harmonization, 1996). Legemidler markedsført etter 1. januar 1998 er testet i henhold til disse retningslinjene (Kristensen, 2004). Ustabile produkter vil kunne oppnå tilfredsstillende kvalitet ved bruk av passende merking og beskyttende emballasje (Anderson, 1996). Testing av fotostabilitet er kun nødvendig for å finne ut om slik merking og beskyttelse er nødvendig; ved tilstrekkelig beskyttelse av preparatet vil problemet med manglende fotostabilitet være eliminert. *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* var på markedet før 1998 og det er ikke publisert tester for dette preparatet under de standardiserte betingelsene. Både det svenske og det norske preparatet er imidlertid merket med en advarsel som tilsier at preparatet må beskyttes mot lys (Vedlegg 2: Etikett fra dagens norske preparat, side 109, og Vedlegg 3: Etikett fra dagens svenske preparat, side 109)

Passende eksponeringstid for synlig lys ble av ICH fastsatt til 1,2 millioner lux timer (Anderson, 1996). Dette tilsvarer 2-3 dagers eksponering i en solfylt vinduspost om sommeren, ca. 12 dager ved plassering av preparatet en meter fra et vindu eller ca. 100 dager under kunstig lys ved 500 lux (24 timer/døgn). Det antas at produktene lagres under forhold der de er relativt lite utsatt for naturlig lys. Som tidligere nevnt er ICHs minstekrav til toleranse for UV-eksponering (320-400 nm) satt til 200 watt timer/m². Dette tilsvarer 1-2 dager i en solfylt vinduspost, eller ca. 50 dager en meter

fra et vindu. UV-eksponering under 320 nm er ikke nødvendig da stråling under 320 nm er neglisjerbar ved vindusfiltrert dagslys. En xenonlampe med vindusglassfilter som fjerner stråling < 320 nm imiterer vindusfiltrert lys godt og er ofte brukt ved testing av fotostabilitet. Studiene gjort i denne oppgaven er utført med xenonlampe og vindusglassfilter.

Prøver ble bestrålt i 2,9 timer ved 765 w/m² for å nå minstekravet for UV-bestråling, og 7,1 timer for å nå minstekravet til bestråling ved synlig lys. Produktet ble testet for fotostabilitet i en transparent polypropylenbeholder med skrukork slik at prøveuttak etter 2,9 timer ble enkelt. Om fenylefrinløsningen er stabilt i glassampullen (primæremballasjen), men ustabil uten denne, må produktet merkes for å unngå overføring til mindre beskyttende primærpakning. Ved bruk av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* under en operasjon, er det vanlig å overføre innholdet av 3-4 ampuller til en BD Plastipaksprøyte av polypropylen som så blir liggende klar til bruk. Dette gjør at fenylefrinløsningen kan eksponeres for en blanding av vindusfiltrert naturlig lys og kunstig lampelys i det tidsrommet en operasjon pågår. Operasjonsstuen er plassert slik at pasienten ikke utsettes for direkte sollys. Dermed er eksponeringen for denne type lys liten.

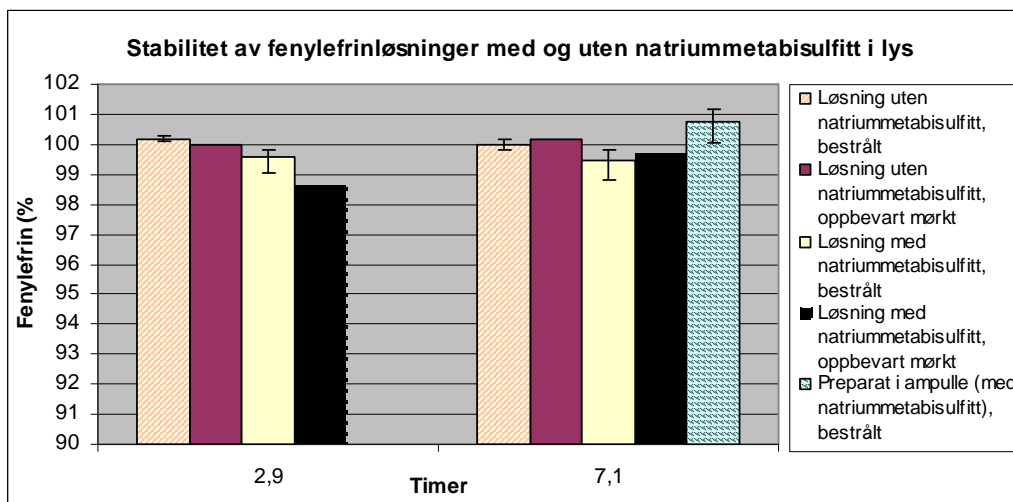
Sammenligning av transmisjonsspekteret for polypropylenrørene benyttet til testing av fotostabilitet og BD Plastipaksprøytene som preparatet trekkes opp i før en operasjon, viser at rørene benyttet i fotostabilitetsstudien slipper gjennom noe mer lys enn sprøytene (Vedlegg 5: Transmisjonsspekter for polypropylenrør benyttet i lysforsøk utført i Suntest CPS, side 111, og Vedlegg 6: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket BD Plastipak (20 ml) som benyttes ved sykehusets operasjonsstuer, side 112). Det er rimelig å anta at *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* opptrukket på en BD Plastipaksprøyte vil være minst like stabil i lys som prøvene i fotostabilitetsforsøket. Terumo- og Codansprøytene som er omtalt i kapittel 4.5.1 slipper også gjennom noe mindre lys enn rørene som ble benyttet i fotostabilitetstestene (Vedlegg 7: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Terumo (20 ml), side 113 og Vedlegg 8: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Codan (20 ml), side 114)

4.5.2.1 Med og uten natriummetabisulfitt

Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske skal ifølge preparatmerkingen beskyttes mot lys. Natriummetabisulfitt er tilsatt preparatet for å øke holdbarheten av løsningen. Det var ønskelig å se om natriummetabisulfitt påvirket stabiliteten av fenylefrin når preparatet ble utsatt for lys. Prøver med og uten natriummetabisulfitt ble derfor testet i henhold til ICHs kriterier for fotostabilitetstesting (International Conference of Harmonization, 1996). Mørkeprøver ble benyttet for å detektere eventuell effekt av temperaturvariasjon og/eller fordampning. Disse prøvene ble pakket inn i aluminiumsfolie. Ingen av prøvene ble degasset. *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* (preparat på ampulle) ble undersøkt i primæremballasjen. Preparatet ble degasset under produksjon.

Ampulleprøver

Diagrammet viser at fenylefrinkonsentrasjonen for ampulleprøvene tilsynelatende har steget svakt (0,8 %) etter 7,1 time bestråling (Figur 27). Økningen er imidlertid innenfor feilmarginen man må regne med at analysemetoden har. Det ser dermed ikke ut til at strålingen har påvirket preparatet på en måte som vil ha praktisk betydning. Merkingen som krever at preparatet skal beskyttes mot lys kan vurderes fjernet.



Figur 27: Løsninger med og uten natriummetabisulfitt bestrålt i Suntest CPS (n=5). Prøver innpakket i aluminiumsfolie er merket "oppbevart mørkt" (n=1). Laveste og høyeste verdi er avmerket i diagrammet. Kun preparatet i glassampullene er degasset (n=3).

Løsning uten natriummetabisulfitt

Diagrammet viser at fenylefrinkonsentrasjonen for prøver uten natriummetabisulfitt endret seg ubetydelig (Figur 27). Innhold av fenylefrin i bestrålte prøver etter 2,9 og 7,1 timer var henholdsvis 100,2 % og 100,0 %, mens prøven som ble beskyttet mot lys viste et innhold på 100,0 % og 100,2 % ved de samme oppbevaringstidene.

Løsning med natriummetabisulfitt

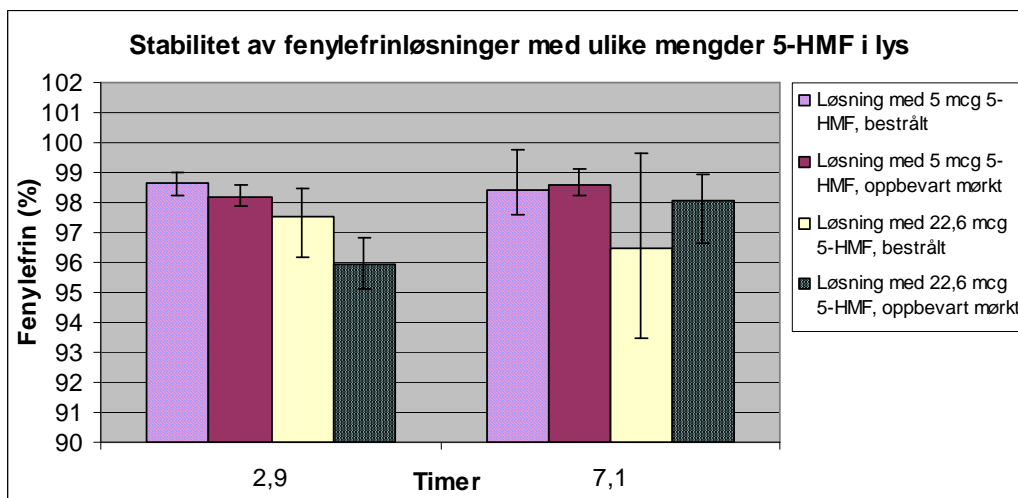
Diagrammet viser at fenylefrinkonsentrasjonen også for prøver med natriummetabisulfitt endret seg ubetydelig (Figur 27). Innholdet av fenylefrin i bestrålte prøver etter 2,9 og 7,1 timer var henholdsvis 99,6 % og 99,5 %, mens konsentrasjonen i prøvene som ble beskyttet mot lys var 98,6 % og 99,7 % ved samme oppbevaringstid. Endringene i fenylefrinkonsentrasjon ved bestråling er små, og ligger innenfor analysemetodens feilmargin. Konsentrasjonsnedgangen var like stor i prøvene som ble oppbevart mørkt, hvilket underbygger at degraderingen ikke bør tilskrives reaksjoner som skyldes bestråling.

Resultatene viser at fenylefrin har et reaksjonsmønster som avviker fra katekolaminenes (Figur 6, side 19), idet katekolaminene brytes ned ved bestråling, særlig i løsninger med bisulfitt (Brustugun, 2005). Metaraminol, et sympatomimetikum som i likhet med fenylefrin ikke har katekolaminstruktur, har tidligere blitt vist å være stabil ved testing for fotostabilitet, også i løsninger med bisulfitt. Fenylefrin ser dermed ut til ligne metaraminol mer enn katekolaminer.

4.5.2.2 Ulike mengder 5-HMF

5-HMF blir dannet ved autoklaving av glukoseløsninger (Ulbricht et al., 1984). Ved bestråling av 5-HMF i en løsning med oksygen med lys med bølgelengde < 340 nm, vil det dannes singlettoksygen (Brustugun et al., 2005). Singlettoksygen kan videre bryte ned hjelpestoffer og virkestoffer som er blandet ut i glukoseløsninger. Det er tidligere vist at katekolaminer (0,1 mg/ml) i glukose 50 mg/ml infusjonsløsning som utettes for ICHs fotostabilitetstest brytes ned (Brustugun et al., 2004). Store likheter mellom strukturen til fenylefrin og katekolaminet adrenalin (Figur 5, side 18) gjorde det interessant å undersøke hvorvidt samme degraderingsprosess kan påvirke

fenylefrin. Glukoseløsninger kan inneholde maksimalt ca. 22,6 µg/ml 5-HMF (Brustugun, 2005). Konsentrasjonen av 5-HMF i kommersielt tilgjengelige glukoseløsninger er normalt mellom 1 og 10 µg/ml. Når det lages løsninger av en normal og en maksimal konsentrasjon 5-HMF er 5 µg/ml valgt som en "normal" konsentrasjon, mens den maksimale konsentrasjonen er satt til 22,6 µg/ml. Løsningene ble testet for fotostabilitet i henhold til ICHs krav. Mørkeprøver ble benyttet for å detektere effekt av temperaturvariasjon og/eller fordampning. Ingen prøver ble degasset.



Figur 28: Løsninger med normal og høy konsentrasjon av 5-HMF bestrålt i Suntest CPS (n=6). Prøver innpakket i aluminiumsfolie er merket "oppbevart mørkt" (n=3). Laveste og høyeste verdi er avmerket i diagrammet. Prøvene er ikke degasset.

Løsning med normal konsentrasjon av 5-HMF

Diagrammet viser at fenylefrinkonsentrasjonen for prøver med en normal konsentrasjon av 5-HMF (5 µg/ml) er stabil (Figur 28). Innhold i bestrålte prøver etter 2,9 og 7,1 timer var henholdsvis 98,6 % og 98,4 %. Det er heller ikke signifikant forskjell ($p > 0,05$) mellom prøver som ble bestrålt og prøver som ble lysbeskyttet. Prøver som ble beskyttet mot lys viste 98,2 % og 98,6 % gjenværende mengde fenylefrin etter henholdsvis 2,9 og 7,1 timers oppbevaring.

Løsning med høy konsentrasjon av 5-HMF

Diagrammet antyder at fenylefrinkonsentrasjonen i prøver med høy konsentrasjon av 5-HMF (22,6 µg/ml) gikk noe ned (Figur 28). Innhold i bestrålte prøver etter 2,9 og 7,1 timer var henholdsvis 97,5 % og 96,5 %, mens det i prøver som ble beskyttet mot lys var igjen henholdsvis 95,9 % og 98,1 % fenylefrin etter samme bestrålingstid. Variasjonen i analysesvarene er imidlertid relativt stor og det er ikke signifikant forskjell ($p > 0,05$) på prøver som er bestrålt og prøver som er lysbeskyttet. Det kan dermed se ut til at 5-HMF ikke fører til nedbrytning av fenylefrin ved lyspåvirkning, verken ved en normal eller en maksimal konsentrasjon.

Fortynning av fenylefrin med glukoseløsninger ble sannsynligvis gjort ute på sykehusavdelingene tidligere. En uformell spørreunde på de aktuelle avdelingene indikerer imidlertid at dette ikke gjøres lengre, sannsynligvis fordi fenylefrin nå lages i en lavere konsentrasjon enn før. Forsøket ville på grunn av dette uansett få liten betydning for anbefalinger ved bruk i lys. Det har imidlertid vist at 5-HMF ikke påvirker fenylefrin betydelig ved bestråling, noe som igjen viser ulikheten mellom fenylefrin og katekolaminer med hensyn på stabilitet.

4.5.3 Langtidsstabilitet

I interne retningslinjer for Sykehusapoteket ved Rikshospitalet er det fastsatt en verdi for "shelf life" på 90 %. Dette medfører at *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* vil betraktes som holdbar inntil 10 % av virkestoffet er brutt ned. Studiene på langtidsstabilitet vil fortsette til forsøket er planlagt å skulle avsluttes (henholdsvis 3 måneder for pilotbatchen og 3 år for langtidsstabilitetsstudien ved "normale" betingelser; 25 °C og 60 % RH), eller til 10 % av virkestoffet er brutt ned.

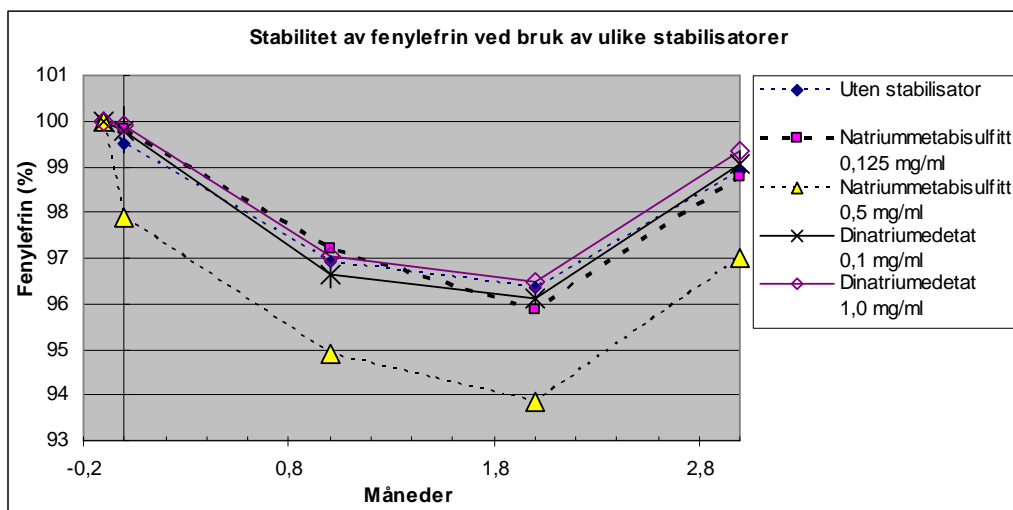
4.5.3.1 Pilotbatch

Resultater fra tidligere forsøk utført i hovedfagsoppgaven ved høy temperatur (4.3.1 Effekt av natriummetabisulfitt på stabilitet, side 73, 4.3.2 Effekt av ulike stabilisatorer på stabilitet, side 76, og 4.3.3 Effekt av nitrogengassing på stabilitet, side 79) gjorde det interessant å undersøke den stabiliserende effekten av visse konsentrasjoner av natriummetabisulfitt og dinatriumedetat, samt en løsning uten stabilisator, ved normale oppbevaringsbetingelser. Fem typer løsninger som inneholdt fenylefrin 0,1 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml ble undersøkt:

1. Fenylefrin 0,1 mg/ml og natriumklorid 8,6 mg/ml alene
2. En løsning med natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml
3. En løsning med natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml
4. En løsning med dinatriumedetat 0,1 mg/ml
5. En løsning med dinatriumedetat 1,0 mg/ml

Løsningene ble degasset med nitrogen og autoklavert i en normal autoklaveringscyklus (16 minutter ved 121 °C). Konsentrasjonsutviklingen ble fulgt over tre måneder.

I løsningen uten stabilisator var konsentrasjonen $99,5 \pm 0,3$ % etter autoklaving i 16 min ved 121 °C (Figur 29). Konsentrasjonen falt deretter noe raskere den første måneden (til $96,1 \pm 0,2$ % fenylefrin) enn den neste, og analysene til og med 2 måneder ($96,4 \pm 0,2$ % fenylefrin) kunne tyde på at nedbrytningen avtok med tiden. Ved analysetid 3 måneder ($98,9 \pm 0,2$ % fenylefrin) ses imidlertid at konsentrasjonen tilsynelatende har økt og nærmer seg utgangskonsentrasjonen. Variasjonene er imidlertid små.



Figur 29: Mengde gjenværende fenylefrin som funksjon av oppbevaringstid i romtemperatur ved bruk av ulike stabilisatorer (dinatriumedetat 1,0 mg/ml: n=5 grunnet ett svært avvikende analyseresultat i en av HPLC-injeksjonene for en av prøvene, ellers: n=6). Prøvene er autoklavert ved en normal autoklaveringscyklus. Høyeste standardavvik på 0,65 % ble sett i en prøve stabilisert med natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml.

Trenden fra prøvene uten stabilisator kan sees i alle de andre prøvene, og konsentrasjonskurvene løper relativt parallelt gjennom de tre månedene. Det er grunn til å tro at den tilsynelatende stigningen i konsentrasjon etter tre måneders lagring skyldes analysemetoden og ikke en reell stigning i konsentrasjon.

Forsøket bekreftet tidligere funn gjort ved langtids varmebehandling av ikke-degassede prøver; natriummetabisulfitt 0,5 mg/ml (konsentrasjonen som brukes i dagens preparat) gir dårligst stabilitet (gjenværende mengde fenylefrin etter 3 måneder var $97,0 \pm 0,4$ %). Resultatet samsvarer likevel ikke med tidligere undersøkelser av degassede prøver (Tabell 40, side 80). Forskjellene er imidlertid for små til å snakke om betydelige effekter. De andre stabiliseringsalternativene oppnår tilnærmet lik stabilitet etter 3 måneder; dinatriumedetat 0,1 og 1,0 mg/ml inneholdt henholdsvis $99,4 \pm 0,2$ % (n=5) og $99,1 \pm 0,3$ % (n=6) fenylefrin, mens løsningen uten stabilisator inneholdt $98,9 \pm 0,2$ % (n=6) fenylefrin. Gjenværende mengde virkestoff i løsningen med natriummetabisulfitt 0,125 mg/ml var $98,8 \pm 0,3$ %.

Dagens mengde natriummetabisulfitt (0,5 mg/ml) ser dermed ut til å ha en oksiderende virkning. God stabilitet er vist i løsning uten natriummetabisulfitt eller med natriummetabisulfitt i små mengder, og natriummetabisulfitt bør reduseres eller fjernes helt.

4.4.3.2 Stabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*

For å oppnå en rasjonell produksjon er det viktig at preparater har god holdbarhet. *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* har per 31. oktober 2007 en holdbarhetstid på 6 måneder. Det er vanlig å sette 6 måneders holdbarhet på preparater som produseres magistrelt om man ikke har egne stabilitetsstudier og om man ikke har særlige grunner til å mistenke at produktet har dårlig stabilitet. 6 måneders holdbarhet er tidligere anbefalt for et produkt med fenylefrin 2,5 mg/ml i isoton saltløsning (Weber, 1969). Rikshospitalets fenylefrinpreparat avviker fra dette preparatet på flere måter; først ved at konsentrasjonen av fenylefrin er lavere (0,1 mg/ml mot 0,25 mg/ml) og dernest ved at det er stabilisert ved hjelp av natriummetabisulfitt. Det svenske preparatet som produseres av Apoteket AB har holdbarhetstid 2 år (1.3.1 Rikshospitalets fenylefrinpreparat, side 22). Det norske og det svenske preparatet inneholder lik mengde av virkestoff og hjelpestoffer, men den svenske produksjonsmetoden er ukjent. De nevnte faktorene gjør at det er interessant å utføre

en stabilitetsstudie på den foreliggende formuleringen med tanke på å utvide holdbarhetstiden.

Stabilitetsstudien ved romtemperatur (25 °C, 60 % RH) for fenylefrinpreparatet som i dag rutinemessig produseres ved Sykehusapoteket, Rikshospitalet, er utført frem til og med 6 måneder (Tabell 41, side 100, og Vedlegg 11: Resultatoversikt fra stabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*, side 117). Konsentrasjonen i prøvene peker mot at holdbarheten er bedre enn de 6 månedene som man i dag opererer med. Studiet vil fortsette etter avslutning av denne oppgaven. Det er avsatt plass til innføring av videre resultater i Vedlegg 11: Resultatoversikt fra stabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*, side 117.

Tabell 41: Stabilitetsdata etter at 6 måneder av langtidsstabilitetsstudien er gjennomført (studien har endepunkt etter 3 år) (n=6)

Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i>						
Oppbevarings- tid (måneder)	Analyse utført	Konsentrasjon (µg/ml)	SD (µg/ml)	pH	Lednings- evne (mS/cm)	Utseende
0	23. mars 2007	97,7	0,2	3,57	14,2	Klar og uten farge
3	22. juni 2007	99,9	0,2	3,42	15	Klar og uten farge
6	21. sept. 2007	98,4	0,3	3,42	15	Klar og uten farge

5. KONKLUSJON

- En langtidsstabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* viser at preparatet er stabilt i minst 6 måneder.
- Natriummetabisulfitt er ikke nødvendig for å stabilisere fenylefrin ved normale produksjons- og oppbevaringsbetingelser. Stabilitetsforsøk av bisulfittfri løsning viste at en løsning *uten* natriummetabisulfitt gir minst like god stabilitet som dagens konsentrasjon av natriummetabisulfitt (0,5 mg/ml). Forsøket gikk over tre måneder.
- I oksygenholdige løsninger som varmebehandles over lengre tid (121 °C, 10 timer), har natriummetabisulfitt en ugunstig effekt på stabiliteten når stabilisatoren er tilsatt i en konsentrasjon som tilsvarer konsentrasjonen i dagens preparat (0,5 mg/ml). Både høyere og lavere konsentrasjon av natriummetabisulfitt gir bedre stabilitet i disse løsningene.
- Ved temperaturakselererte forsøk med kombinasjoner av ulike stabilisatorer, ble det vist at en stabilisatorkombinasjon av natriummetabisulfitt i relativt høy konsentrasjon sammen med en lav konsentrasjon av dinatriumedetat ga de mest stabile fenylefrinløsningene. En lav konsentrasjon av dinatriumedetat som eneste stabilisator viste også gode resultater. Ved normale produksjons- og oppbevaringsbetingelser ga ikke natriummetabisulfitt og dinatriumedetat hver for seg økt stabilitet ved sammenligning med løsninger uten stabilisator.
- Ved økt temperatur er gassing med nitrogen nødvendig når løsningene inneholder natriummetabisulfitt. Det oppnås også økt stabilitet i løsninger uten natriummetabisulfitt, selv om effekten ikke er like tydelig i disse løsningene.
- Det tar ca. 16 minutter å degasse 10 L fysiologisk saltvann med nitrogen med gasshastighet 6 L/min. I volumer på 20-40 L lot det seg ikke gjøre å degasse løsningene til oksygenfrihet. Om det skal lages løsninger der det er essensielt med et lavt nivå av oksygen, bør derfor produksjonsvolumet være ≤ 10 L og det bør benyttes en rundkolbe. Gasshastigheten bør være høyest mulig.

- Ved oppbevaring av preparatet på sprøyte, skilles det over tid ut et stoff fra sprøyter av merket BD Plastipak. Bruk av denne sprøytetypen bør derfor unngås om preparater skal være fylt på sprøyte over noe tid.
- *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* er stabil ved romtemperatur i minst 14 dager når preparatet oppbevares på sprøyter av merkene Codan eller Terumo. Det ble ikke påvist forurensning fra sprøyten av merket Terumo. Noe utskillelse (i form av nye topper i HPLC-kromatogrammet) ble sett i prøvene som ble oppbevart i Codansprøytene.
- Fenylefrin er stabilt i lys. Dette gjelder både preparatet i glassampulle og preparatet fylt på emballasje av polypropylen. Stoffet er heller ikke følsomt for lys når det foreligger i løsning sammen med 5-HMF. Fenylefrin er dermed ikke utsatt for en fotokjemisk nedbrytningsmekanisme som regnes som viktig i glukoseløsninger.

6. REFERANSER

- Al-Kaysi, H. N., M. S. Salem and N. Al-Khalili (1985) HPLC analysis and preliminary stability study of naphazoline nitrate and phenylephrine hydrochloride in dosage form. *Dirasat B.* 12: s.101-112.
- Al Taii, R. A., J. B. Stanford and J. K. Sugden (1982) Some aspects of the photolysis of aqueous solutions of phenylephrine hydrochloride. *Pharmaceutica acta Helveticae.* 57: s.56-60.
- Anderson, N. H. (1996) Photostability testing: Design and interpretation of tests on drug substances and dosage forms I: H. H. Tønnesen (Ed.). *Photostability of Drugs and Drug Formulations.* 1.utgave. Taylor and Francis Ltd, London.
- Apoteket AB (2006) Produktresumé: Fenylefrinhydroklorid APL 0,1 mg/ml injektionsvätska, lösning. Lesedato: 09. nov. 2006, fra http://www.apoteket.se/rd?d=3172&a=6420&tab=products&PerformSearch=true&search_category_recursive=true&sort_attribute_1=product_name&sort_direction_1=ascending&simpleSearch=yes&search_online=true&ProfileGroupName=default&Filter=true&search_attribute_keyword=name&search_query_keyword=fenylefrinhydroklorid.
- Atlas material testing solutions (1996) *Suntest CPS/ Suntest CPS+.* A comment on photostability testing according to ICH. Atlas material testing technology BV, Gelnhausen, Tyskland.
- Betigeri, S., A. Thakur and K. Raghavan (2005) Use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs. *Pharmaceutical Research.* 22: s.310-317.
- Boxhammer, J. and A. Schönlein (2004) Technical requirements and equipment for photostability testing I: H. H. Tønnesen (Ed.). *Photostability of Drugs and Drug Formulations.* 2.utgave. CRC Press, Boca Raton.
- Brustugun, J. (1999) *Formulering, stabilitetsundersøkelse og analyse av løsninger til epiduralanalgesi.* Universitetet i Oslo, Oslo. Hovedfag.
- Brustugun, J. (2005) *Photostability of catecholamines in infusion solutions.* Universitetet i Oslo, Oslo. Doctor Scientiarum.
- Brustugun, J. (2006) Validering av HPLC metode for fysostigmin. Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo.
- Brustugun, J., S. Kristensen and H. H. Tønnesen (2004) Photostability of sympathomimetic agents in commonly used infusion media in the absence and presence of bisulfite. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 58: s.296-308.
- Brustugun, J., H. H. Tønnesen, R. Edge and S. Navaratnam (2005) Formation and reactivity of free radicals in 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde - the effect on isoprenaline photostability. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology.* 79: s.109-119.
- Brænden, J. U., T. L. Stendal and C. B. Fagernæs (2003) Stability of dopamine hydrochloride 0,5 mg/ml in polypropylene syringes. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* 28: s.471-474.
- Chandran, S. and R. S. P. Singh (2007) Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie.* 62: s.4-14.
- Chapman, D. G. (2004) Parenteral products I: A. J. Winfield and R. M. E. Richards (Eds.). *Pharmaceutical Practice.* 3.utgave. Churchill Livingstone, Oxford.
- Clarke, G. S. (1994) The validation of analytical methods for drug substances and drug products in UK pharmaceutical laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 12: s.643-652.
- Connors, K. A. (1986) Epinephrine I: K. A. Connors, G. L. Amidon and V. J. Stella (Eds.). *Chemical Stability of Pharmaceuticals; a Handbook for Pharmacists.* 2.utgave. John Wiley & Sons, New York: s.438-447.
- Connors, K. A. (1986) L-ascorbic acid I: K. A. Connors, G. L. Amidon and V. J. Stella (Eds.). *Chemical Stability of Pharmaceuticals; a Handbook for Pharmacists.* John Wiley & Sons New York.
- das Gupta, V. (2004) Chemical stability of phenylephrine hydrochloride after reconstitution in 0,9 % sodium chloride injection for infusion. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* 8: s.153-155.
- das Gupta, V. and R. L. Mosier (1972) Stability of phenylephrine hydrochloride nasal drops. *American Journal of Hospital Pharmacy.* 29: s.870-873.
- das Gupta, V. and J. Parasrampur (1987) Quantitation of phenylephrine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 13: s.473-486.
- European Pharmacopeia (2007) Council of Europe. 5.utgave, Strasbourg, France.

- Encyclopedia of Excipients for Pharmaceuticals, Cosmetics and Related Areas* (2002) H. Fielder and P. Fielder. 5.utgave, Editio Cantor Verlag, Aulendorf.
- Florence, A. T. and D. Attwood (1998) *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 3.utgave. Palgrave, New York.
- Gaglia Jr., C. A. (1972) Phenylephrine hydrochloride I: Flory (Red.) (Ed.). *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press, New York 3: s.483-512.
- Garcia, A., F. J. Ruperez, A. Marin, A. de la Maza and C. Barbas (2003) Poly(ethyleneglycol) column for the determination of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 785: s.237-243.
- Ghanekar, A. G. and V. das Gupta (1978) Applications of paired ion high-pressure liquid chromatography to catecholamines and phenylephrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 67: s.1247-1250.
- Greibrokk, T., E. Lundanes and K. E. Rasmussen (1998) *Kromatografi*. 3.utgave. Universitetsforlaget, Norge.
- International Conference of Harmonization (1996) Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B. Lesedato: 27. okt. 2007, fra <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA412.pdf>.
- International Conference of Harmonization (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). Lesedato: 27. sept. 2007, fra <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- Kiser, T. H., A. R. Oldland and D. N. Fish (2007) Stability of phenylephrine hydrochloride injection in polypropylene syringes. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 64: s.1092-1095.
- Kristensen, S. (2004) Photostability of parenteral products I: H. H. Tønnesen (Ed.). *Photostability of Drugs and Drug Formulation*. 2.utgave. CRC Press, Boca Raton.
- Lausier, J. M., G. E. Osborne and A. N. Paruta (1976) Utility of gas permeation as a means of protection for oxygen sensitive systems. *Drug Development Communications*. 2: s.91-107.
- Marin, A. and C. Barbas (2004) LC/MS for the degradation profiling of cough-cold products under forced conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 35: s.1035-1045.
- Martindale: The Complete Drug Reference* (2007) S. C. Sweetman. 35.utgave, Pharmaceutical press, London.
- Massad, W. A., S. G. Bertolotti, M. Romero and N. A. Garcia (2005) A kinetic study on the inhibitory action of sympathomimetic drugs towards photogenerated oxygen active species. The case of phenylephrine. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*. 80: s.130-138.
- Millard, B. J., D. J. Priaux and E. Shotton (1973) The stability of aqueous solutions of phenylephrine at elevated temperatures: identification of the decomposition products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 25(Suppl.): s.24-31.
- Miller, D. M., G. R. Buettner and S. D. Aust (1990) Transition metals as catalysts of "autooxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*. 8: s.95-108.
- Nema, S., R. J. Brendel and R. J. Washkuhn (2002) Excipients- their role in parenteral dosage forms I: J. Swarbrick (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2.utgave. Marcel Dekker, Inc, New York: s.1164-1187.
- Olmo, B., A. Garcia, A. Marin and C. Barbas (2005) New approaches with two cyano columns to the separation of acetaminophen, phenylephrine, chlorpheniramine and related compounds. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 817: s.159-165.
- Ossman, A. R. (1980) Determination of phenylephrine in presence of its decomposition products. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 35: s.445-450.
- Owen, S. C. (2003) Edetic acid I: R. C. Rowe, P. J. Sheskey and P. J. Weller (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4.utgave. Pharmaceutical Press, Grayslake, Illinois.
- Roos, P. J. (1993) *Epidural Administration of Opioids in Home Care: some pharmaceutical and clinical aspects*. Faculteit Geneeskunde, Universiteit Utrecht, Utrecht.
- Schieffer, G. W. and D. E. Hughes (1983) Simultaneous stability-indicating determination of phenylephrine hydrochloride, phenylpropanolamine hydrochloride, and guaifenesin in dosage forms by reversed-phase paired-ion high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 72: s.55-59.
- Schroeter, L. C. (1961) Sulfurous acid salts as pharmaceutical antioxidants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 50: s.891-901.

- Senyuva, H. and T. Ozden (2002) Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of paracetamol, phenylephrine HCl, and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Chromatographic Science*. 40: s.97-100.
- Shabir, G. A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*. 987: s.57-66.
- Shotton, E. and D. J. Prialx (1974) An assay for phenylephrine applicable to stability studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 26: s.197-200.
- Snyder, L. R. (1974) Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography*. 92: s.223-230.
- Stewart, J. T. (2003) Sodium metabisulfite I: R. C. Rowe, P. J. Sheskey and P. J. Weller (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4. utgave. Pharmaceutical Press, Grayslake, Illinois.
- Stodghill, S. P. (2003) Ascorbic acid I: R. C. Rowe, P. J. Sheskey and P. J. Weller (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4. utgave. Pharmaceutical Press, Grayslake, Illinois.
- Sykehusapoteket ved Rikshospitalet (2007). Analyseforskrift for Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, V.nr. 711303 Oslo, Sykehusapotekene ANS.
- The Pharmaceutical codex* (1979) The Pharmaceutical Press, London.
- Handbook on Injectable Drugs* (1994) L. A. Trissel. 8. utgave, American society of hospital pharmacists, Bethesda, Maryland.
- Ulbricht, R. J., S. J. Northup and J. A. Thomas (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. 4: s.843-853.
- United States Pharmacopoeia 30* (2007) The United States Pharmacopoeial Convention. Board of Trustees, Rockville, Maryland.
- Weber, C. R. (1969) *The Stability of Phenylephrine Hydrochloride in Intravenous Solutions*. The Faculty of the College of Pharmacy, University of Houston, Houston. Masteroppgave.
- Weber, C. R., das Gupta, V. (1970) Stability of phenylephrine hydrochloride in intravenous solutions. *The Journal of Hospital Pharmacy*: s.200-208.
- Wikipedia contributors (2007) Pro-oxidant. Lesedato: 8 nov. 2007 fra <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Pro-oxidant&oldid=148000638>

7. VEDLEGG

Vedlegg 1: Hovedforskrift for *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske* per 15.mars 2007

Sykehusapoteket ved Rikshospitalet

Hovedforskrift

Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske

Batch nr:	Enhet: 5 ml ampulle	Utløpsdato:	Beskyttes mot lys Oppbevaring: 15 – 25 °C
Batch str.: 20 liter	Forskrift: Nycomed Pharma	Utskrevet av: 16/1-07 R. Jørgen	
Holdbarhet: 6 mnd.	Dokument nr.: HF-S0004	Godkjent av TLV: 19/1-07 S. M. L. L. L.	
Produksjonstype: Resepturleie	Versjon nr.: 5.0	Godkjent av K.farm.: 21/1-07 A. Solberg	
Produksjonsstart:	Endring: Etiketter	Arb.seddel klargjort av:	

RÅVARER/AVVEIING

OBS! Ved avveiling og blanding: Bruk støvmaske! I er farlig ved svelging. Ved svelging, kontakt lege omgående og vis beholderen eller etiketten.

Sign

Veierom klargjort og vekt kontrollert (P-PRO-204)

Nr	Innholdsstoffer:	Mengde	Anmerk.	Kontroll nr	Vekt	AS	KS
I	Phenylephrini hydrochloridum	2,0 g			1		
II	Natrii metabisulfis	10,0 g			1		
III	Natrii chloridum ad usum parent.	172,8 g			1		
IV	Vann til injeksjon i bulk (WFI)	19 874,8 g			4		
		= 20 059,6 g					

FREMSTILLINGSPROSEDYRE

Sign

Blanding	Kolben/tanken er merket med bulketikett	
Gassing: N ₂	IV gasses med nitrogen i 10 min. før blanding	
Blanding	I, II og III løses i IV som er gasset på forhånd	
Gassing: N ₂	Løsningen gasses 10 min. etter blanding	
pH-måling	pH måles	pH =
Gassing: N ₂	Løsningen filtreres over på en mellomkolbe som er gasset med nitrogen 2 min. på forhånd.	

DISPENSERINGSSONE

Sign

Klargjøring av fyllerlinje (P-PRO-204)

Utstyr	Type	Vasket/Steril (jnr)	Lot.nr	
	Rustfri tank			
	Mellomkolbe gasset 2 min m/N ₂			
	Silikonslange gassing mellomkolbe			
	Diverse silikonslanger			
	Ampullepumpe til 5 ml			
	Rota ampullemaskin			
Emballasje	4 000 x 5 ml lukkede ampuller			
Filter	0,2 µm Millex FG (N ₂)	Grense: x ≥ 0,9 bar	Resultat:	
	0,2 µm Millex FG (luft)	Grense: x ≥ 0,9 bar	Resultat:	
	0,45 µm Millipak 4 0	Grense: 1,8 – 3,0 bar	Resultat:	
	Vedlagt filterbevis	Filtertest av alle filtrene etter filtrering		
Gassing: N ₂	Ampullene gasses før fylling			

Kommentarer: Husk å merke brukt utstyr med skiltet "problemvask" før det sendes inn på vaskerommet!

Sykehusapoteket ved Rikshospitalet

Hovedforskrift

Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske

Batch nr:	Enhet: 5 ml ampulle	Utløpsdato:	Beskyttes mot lys Oppbevaring: 15 – 25 °C
-----------	---------------------	-------------	--

ETIKETTERING/PAKKING

	Sign
Etikettering/Pakkesone klargjort (P-TLV-L-205)	
Påbegynt dato:	
Avsluttet dato:	
Pakkemateriell: 10 x 5 ml ampulleeske med blister	
Kassert under etikettering/pakking:	
Kommentarer:	

ETIKETTREGNSKAP

Nr. 1	Trykt	Dok.	Etikettert	Makulert	Sign	Anmerk./kommentarer
Total						
Nr. 2	Trykt	Dok.	Etikettert	Makulert	Sign	Anmerk./kommentarer
Total						
Kommentarer:						

Sykehusapoteket ved Rikshospitalet

Hovedforskrift

Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske

Batch nr:	Enhet: 5 ml ampulle	Utløpsdato:	Beskyttes mot lys Oppbevaring: 15 – 25 °C
UTBYTTEREGNSKAP			Antall
Påfylt fra sterilrom (se side 1):			
Prøver (kjemisk + sterilitetstest, se side 2):			
Kassasjon under gjennomlysning (se side 2):			
Kassasjon under etikettering/pakking (se side 3):			
Referanseprøver: 0	Tatt av (sign):		
Teoretisk utbytte			
Reelt utbytte	Antall enheter:		
	Antall pakninger:		
	Dato/Sign:		
Kommentarer:			
Narkotikaregnskap er ført:			

PRODUKSJONSFARMASØYTYS GODKJENNING

Kommentarer:		
Vedlegg	<input type="checkbox"/> Malvernutskrift <input type="checkbox"/> Autoklavingutskrift	<input type="checkbox"/> Gjennomlysningsskjema <input type="checkbox"/> Avviksskjema
Dokumentasjonen er kontrollert, produksjonen har foregått i henhold til GMP og produksjonen er godkjent		
Dato: Sign:		

KONTROLLFARMASØYTENS FRIGIVELSE

Kommentarer:
Dokumentasjonen er kontrollert, produksjonen har foregått i henhold til GMP og produktet frigis:
Dato: Sign:

Vedlegg 2: Etikett fra dagens norske preparat

7M

Sykehusapoteket ved Rikshospitalet
Utløpsdato: 00/00/0000
Batchnr: 000000
711303

10 x 5 ml 16/1-07

Fenylefrin 0,1 mg/ml y
(metaoxedrin)
injeksjonsvæske

1 ml inneholder:

Fenylefrinhydroklorid	0,1 mg
Natriummetabisulfitt	0,5 mg
Natriumklorid	8,6 mg
og sterilt vann	

Oppbevares i ytteremballasjen
for å beskyttes mot lys 31/1-07 AL

Vedlegg 3: Etikett fra dagens svenske preparat

10 x 10 ml injektionsvätska Vnr 32 20 08

Fenylefrinhydroklorid 0,1 mg/ml ATL

För intravenös injektion Phenylephrini hydrochlorid: 0,1 mg,
För engångsbruk natrii metabisulfis 0,5 mg,
natrii chloridum 8,6 mg et
aqua ad injectabilia ad 1 ml

Förvalas oåtkomligt för barn Innehåller stabiliseringsmedlet
natriummetabisulfitt

Ljuskänsligt, förvaras i kylskåpet pH 3,0 - 4,5

Apoteket Produktion & Laboratorier

Anv.före: 2008-09
2080743

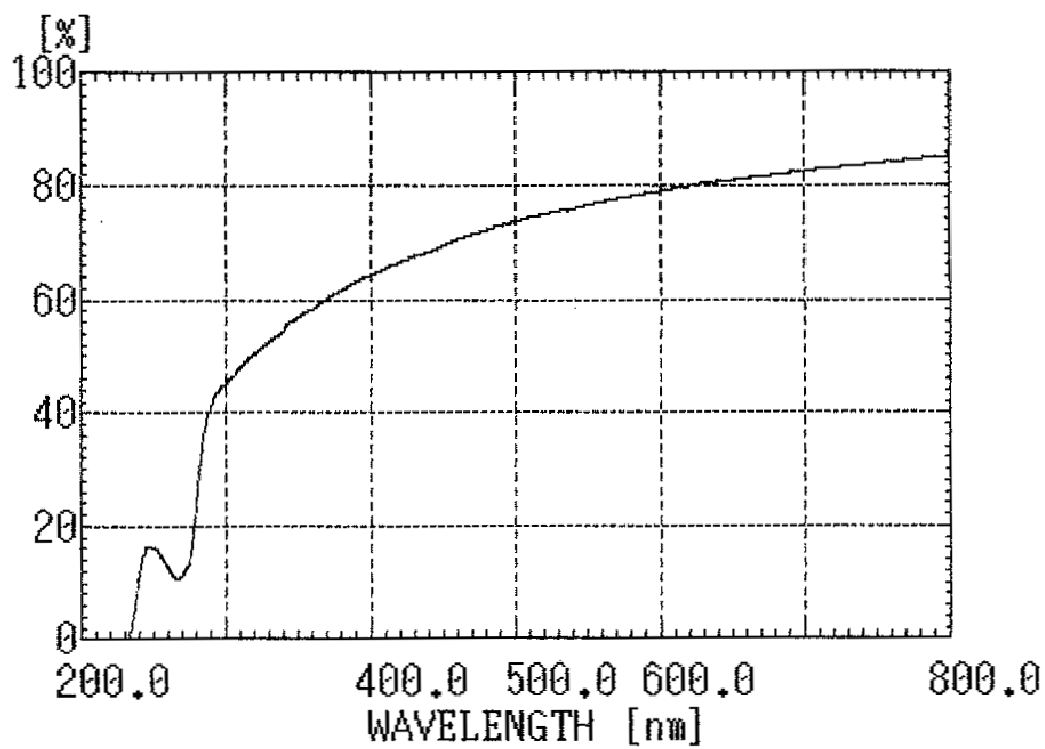
03
7 3 1 3 2 7 3 2 2 0 0 8 6

Vedlegg 4: Oversikt over oppløsning ved validering av metodens robusthet

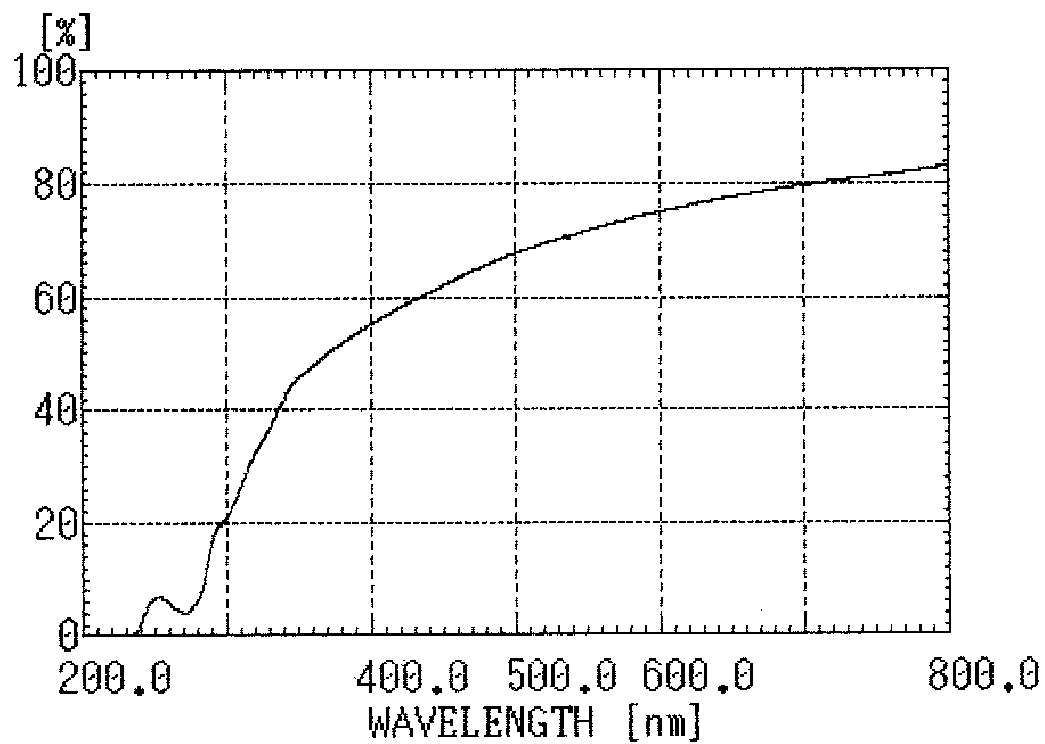
Oppløsning (R) ved validering av metodens robusthet (n=1) ("Degrad.-metode"=degraderingsmetode)

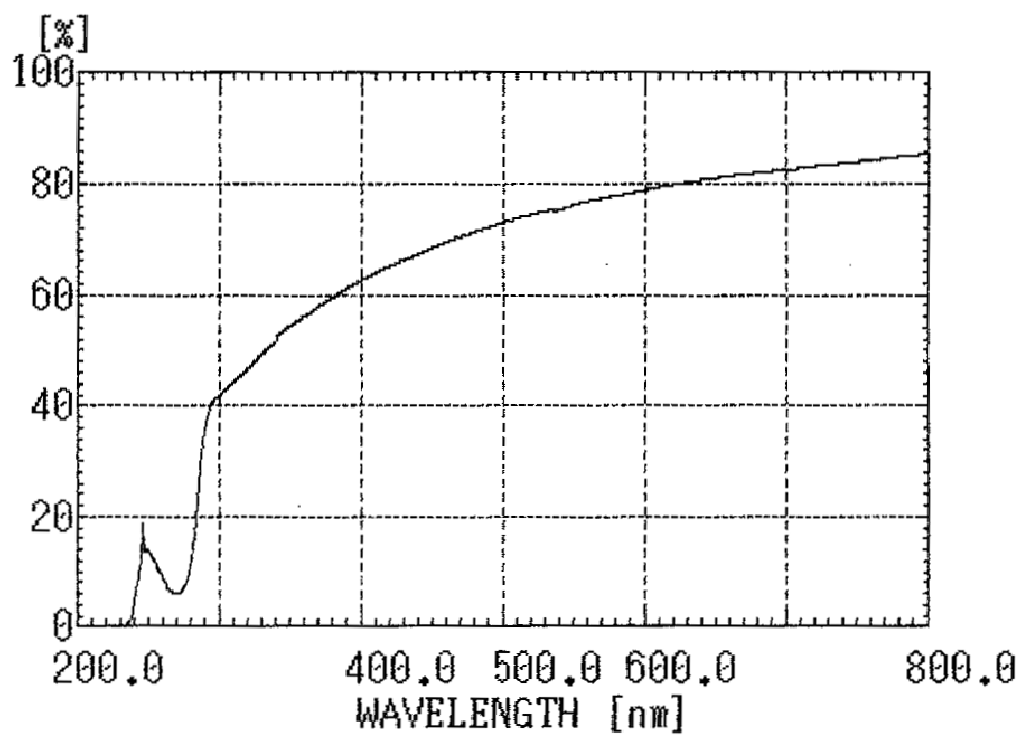
Eksperimentell variabel for mobilfasen	Degrad.-metode for testet prøve	Parallell nr.:	Oppløsning (R) i forhold til nærmeste topp som eluerte tidligere enn fenylefrin:	Oppløsning (R) i forhold til nærmeste topp som eluerte senere enn fenylefrin:
Økt hastighet	Base (pH 8,9)	1	-	1,2
		2	-	1,3
		3	-	1,4
	AAPH	1	-	6,7
		2	-	6,0
		3	-	4,0
Nedsatt hastighet	Base (pH 8,9)	1	5,9	-
		2	5,9	-
		3	5,9	-
	AAPH	1	6,4	-
		2	4,1	-
		3	3,7	-
Økt pH	Base (pH 8,9)	1	5,8	1,6
		2	5,8	1,7
		3	5,9	1,4
Økt pH	AAPH	1	6,4	7,0
		2	6,6	7,4
		3	6,5	3,3
Senket pH	Base (pH 8,9)	1	5,7	1,5
		2	5,7	1,9
		3	5,7	1,4
Senket pH	AAPH	1	6,3	1,8
		2	6,3	6,8
		3	5,4	6,2
Økt andel organisk modifikator	Base (pH 8,9)	1	3,0	6,6
		2	3,0	6,6
		3	3,1	6,7
Økt andel organisk modifikator	AAPH	1	4,4	3,6
		2	3,7	2,3
		3	-	-
Nedsatt andel organisk modifikator (23 %)	Base (pH 8,9)	1	6,6	1,9
		2	6,8	4,4
		3	-	6,8
Nedsatt andel organisk modifikator (23 %)	AAPH	1	6,1	-
		2	-	-
		3	6,2	6,2

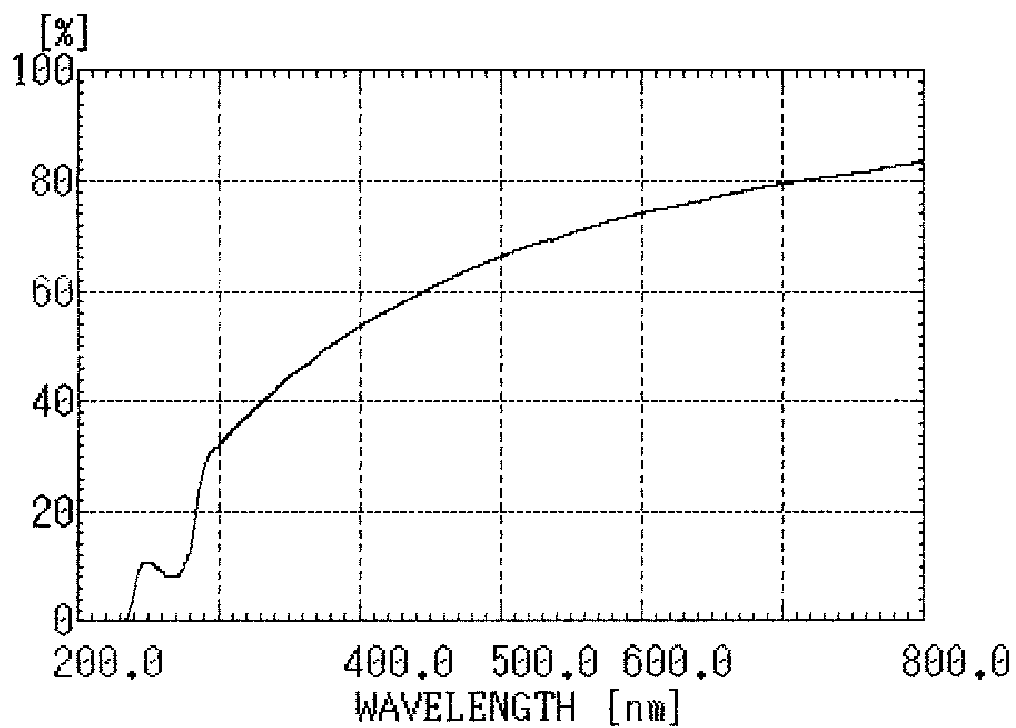
Vedlegg 5: Transmisjonsspekter for polypropylenrør benyttet i lysforsøk utført i Suntest CPS



Vedlegg 6: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket BD Plastipak (20 ml) som benyttes ved sykehusets operasjonsstuer



Vedlegg 7: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Terumo (20 ml)

Vedlegg 8: Transmisjonsspekter for sprøyte av merket Codan (20 ml)

Vedlegg 9: Tabell med resultater fra varmebehandlede fenylefrinløsninger med ulike mengder natriummetabisulfitt

Stabilitet av fenylefrin under varmebehandling etter tilsetning av ulike konsentrasjoner av natriummetabisulfitt. Data fra tre forsøksrekker er gjengitt – fenylefrin 100 µg/ml (n=2) og fenylefrin 50 µg/ml (n=1). Varmebehandling: 121 °C (to sykluser à 5 timer). Resultater er vist i Figur 15, side 73 og Figur 16, side 74.

Fenylefrin (µg/ml)	Varme- behandling	Fenylefrin (µg/ml; %)										
		Konsentrasjon av natriummetabisulfitt (mg/ml)										
		0	0,0625	0,125	0,1875	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	5,0	10,0
50	<i>Før</i>	50,4	-	50,8	-	50,8	51,0	50,7	-	-	-	-
	<i>Etter</i> (%)	41,8 (83,0)	-	43,0 (84,7)	-	39,0 (76,8)	32,6 (63,9)	29,3 (57,8)	-	-	-	-
100	<i>Før</i>	100,6	-	100,6	-	100,8	100,9	101,0	101,5	101,6	-	-
	<i>Etter</i> (%)	92,3 (91,7)	-	93,8 (93,3)	-	89,8 (89,1)	84,5 (83,8)	80,5 (79,7)	87,1 (85,8)	93,9 (92,4)	-	-
100	<i>Før</i>	104,2	102,9	103,2	102,8	102,8	-	103,4	-	-	103,9	103,9
	<i>Etter</i> (%)	90,1 (86,4)	93,1 (90,4)	92,9 (90,0)	91,0 (88,6)	89,3 (86,9)	-	78,4 (75,8)	-	-	98,0 (94,4)	98,7 (95,0)

Vedlegg 10: Stabilitet av dagens preparat i hetteglass og i ulike sprøyter

Stabilitet av dagens preparat i hetteglass og i ulike sprøyter, 22,5 °C og 60 % relativ luftfuktighet

		Fenylefrin (%)				
		Oppbevaringstid (døgn)(22,5 °C og 60 % RH)				
Emballasje		0	0,33	1	7	14
Hetteglass (n=3)	% (lav-høy)	100,0 (99,3-100,6)	98,8 (98,4-99,1)	99,3 (99,0-99,5)	98,9 (98,5-99,5)	99,3 (99,1-99,6)
Codan (n=3)	% (lav-høy)	100,0 (99,3-100,6)	98,8 (98,6-99,1)	99,0 (98,6-99,3)	98,0 (97,6-98,2)	99,5 (98,8-100,4)
Terumo (n=3)	% (lav-høy)	100,0 (99,3-100,6)	98,3 (98,1-98,3)	98,5 (98,1-98,8)	98,9 (98,4-99,3)	99,4 (98,8-99,8)
BD* (n=6)	% (lav-høy)	100,0 (99,3-100,6)	100,0 (98,6-102,4)	101,1 (99,1-104,7)	104,7 (97,8-114,7)	106,5 (98,9-117,1)

*Data for fenylefrin i BD Plastipaksprøytene er ikke pålitelig grunnet koeluering med stoff som utskilles fra denne sprøytetypen.

Vedlegg 11: Resultatoversikt fra stabilitetsstudie av *Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske*

Stabilitetsstudie av <i>Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske</i> (25 °C, 60 % RH)						
Oppbevaringstid (måneder)	Dato for utført analyse	Konsentrasjon (µg/ml)	SD (µg/ml)	pH	Ledningsevne (mS/cm)	Utseende
0	23. mars 2007	97,7	0,2	3,57	14,2	Klar og uten farge
3	22. juni 2007	99,9	0,2	3,42	15,0	Klar og uten farge
6	21. september 2007	98,4	0,3	3,42	15,0	Klar og uten farge
9						
12						
18						
24						
36						

ERRATA

Kapittel 2, s. 31

2.1 STOFFLISTE: f) ”Fenylefrin 0,1 mg/ml injeksjonsvæske, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, batch nr. 601116 og 703306”, skal være: ”..batch nr. 611713 og 703706”. Batch nr. 601116 er skrevet feil gjennom hele oppgaven, mens batch nr. 703706 kun er skrevet feil i stofflisten.

Kapittel 2, s. 45

Tabell 19. ”Stamløsning 1: fenylefrin 1 mg/ml, Fenylefrinhydroklorid 25 mg” skal være ”...Fenylefrinhydroklorid 250 mg”

Kapittel 3, s. 49

Avsnitt 2, linje 3: ”(n=3)” skal være ”(n=1)”

Kapittel 4, s.76

Avsnitt 2, linje 7. Her er det henvist til ”4.3.3 Tabell 39, side 77”. Det skal henvises til ”4.3.3 Tabell 40, side 80”.

Kapittel 4, s.78

Avsnitt 2, linje 4. Her er det henvist til ”Tabell 19, side 45”. Det skal henvises til ”Tabell 39, side 77”.

Kapittel 6 (Referanser), s.105

”The Pharmaceutical codex (1979) The Pharmaceutical Press, London” skal være ”The Pharmaceutical Codex (1979) The Pharmaceutical Society of Great Britain. 11.utgave, The Pharmaceutical Press, London”. Boken er henvist til på side 13 i tabell 1, på nederste linje på side 15, og på side 20, avsnitt 2, linje 4, med henvisningen ”(The Pharmaceutical Society of Great Britain, 1979)” og skal være ”(The Pharmaceutical Codex, 1979, ”Phenylephrine hydrochloride”)”.